

**PRODUKTION MONOKLONALER ANTIKÖRPER
GEGEN EIN HIRNGLIOM DES MENSCHEN**

KATJA STAEMMLER

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Tierpathologie der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aus dem Institut für Pathologie
Abteilung für klinische und experimentelle Neuroonkologie
Städtisches Krankenhaus Bogenhausen
Akademisches Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Produktion monoklonaler Antikörper gegen
ein Hirngliom des Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Katja Staemmler
aus Kiel

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

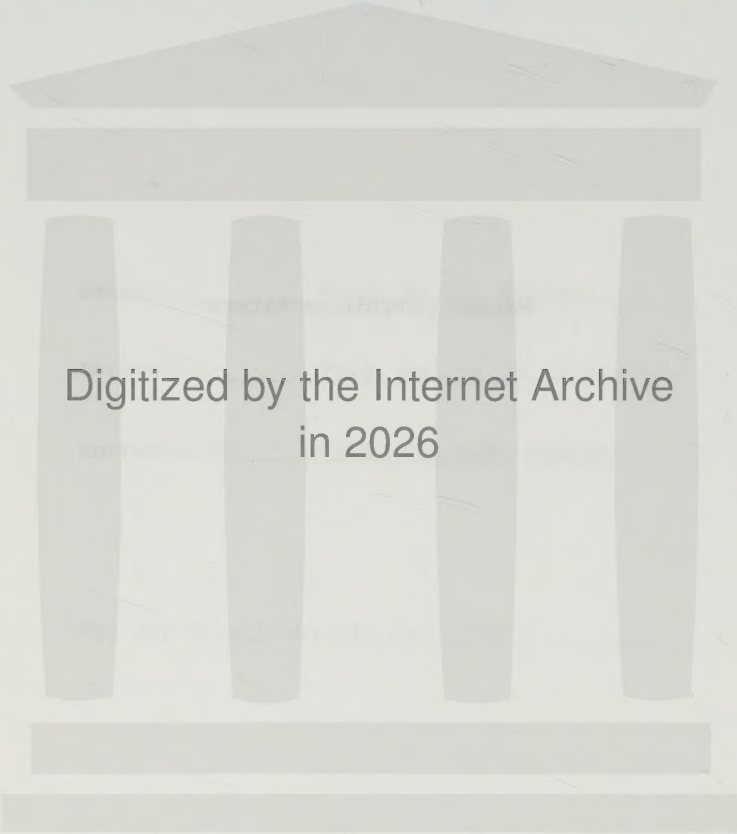
Dekan: _____ Prof. Dr. H. Zucker _____

Referent: _____ Prof. Dr. Dr. D. Stavrou _____

Korreferent: _____ Prof. Dr. D.O. Schmid _____

Tag der Promotion: 24. Juli 1987 _____

Meinen geduldigen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0105

Empfehlung

Empfehlung.

Sich nicht zu ducken:

Das Schiff liefe nicht vorwärts

stünde nicht aufrecht

im Wind

das Segel.

G. Kuhnert

Inhaltsübersicht

A	Einleitung	1
B	Literaturübersicht	3
	1. Antigenität glialer Hirntumoren	3
	2. Transplantationstumoren	4
	3. Immunisierungen	5
	4. Fusionen	7
	5. Hybridome	9
	6. Monoklonale Antikörper	10
C	Problemstellung	12
D	Eigene Untersuchungen	13
	1. Material und Methoden	13
	1.1. Versuchstiere	13
	1.2. Tumormaterial	13
	1.3. Zellmaterial	17
	1.3.1. Tumorzellkulturen	17
	1.3.1.1. Primärkulturen	17
	1.3.1.2. Subkulturen	18
	1.3.1.3. Konservierung von Zellen	18
	1.3.1.4. Darstellung der Zellmorphie	19
	1.3.1.5. Konditioniertes Medium	19
	1.3.1.6. Behandlung von Gliomzellen mit db-cAMP	20
	1.3.2. Myelomzellen	20
	1.3.3. Makrophagenpräparation	21
	1.3.4. Fetale Zellen	22
	1.4. Nachweis der gliaassoziierten Antigene GFAP und S 100	22
	1.5. Nachweis von gliomassoziiertem Antigen mittels der Immunofluoreszenz	23

1.6. Transplantation von Tumoren	24
1.7. Immunisierungen	24
1.8. Fusionen	26
1.9. Nachweis von Immunglobulinen im Zellkultur- Überstand	30
1.9.1. Mikro-ELISA	30
1.9.2. Indirekter Immunperoxidasetest	32
1.9.2.1. Mikrottestplatten	32
1.9.2.2. Gewebeschnitte	34
1.10. Klonierung der Hybridome	35
1.11. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen	36
1.12. Absorptionen	36
1.13. Gewinnung serumfreier Hybridomüberstände	37
1.14. Immunglobulinanreicherung durch Präzipitation	37
1.15. Bestimmung der Immunglobulinklassen	38
2. Ergebnisse	39
2.1. In vitro Kultivation humaner Hirntumoren	39
2.1.1. Wachstumsverhalten	39
2.1.2. Effekt von konditioniertem Medium	39
2.1.3. Lichtmikroskopische Befunde	42
2.1.4. db-cAMP-Differenzierung von Gliomzellen	42
2.1.5. Darstellung von GFA und S 100-Protein	44
2.2. Tumorigenität humaner Gliomzellen in Nacktmäusen	45
2.3. Zellfusion und Selektion von Hybridomklonen	47
2.4. Charakterisierung der sezernierten Immunglobuline	48
2.4.1. Immunodiffusion	48
2.4.2. Gesamtproteinmenge	49
2.5. Reaktivität der erhaltenen monoklonalen Antikörper	50
2.5.1. Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an primäre Hirntumoren	50
2.5.1.1. Gefrierschnitte	50
2.5.1.2. Paraffinschnitte	50

2.5.2.	Vergleich des Bindungsverhaltens von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Gefrier- und Paraffinschnitten	56
2.5.3.	Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Gliomzellkulturen	59
2.5.4.	Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an embryonale Zellen	59
2.6.	Quantitative Absorptionen	61
E	Diskussion	64
F	Zusammenfassung	70
G	Summary	72
H	Literaturverzeichnis	74



A Einleitung

Die Annahme, daß Zellen spontaner (COAKHAM, 1974; KORNBLITH et al., 1974; WOOSLEY et al., 1977; WIKSTRAND et al., 1977) sowie experimenteller Hirntumoren an ihrer Oberfläche sogenannte tumor-assoziierte Antigene tragen, gilt nach weitreichenden Experimenten als gesichert (STAVROU et al., 1976; RAINBIRD et al., 1977; STAVROU et al., 1980, 1982). Die in diesen Tumorzellen auftretenden Antigene werden im intakten Immunsystem als fremd erkannt und gezielt beantwortet.

Trotz der spezifischen Aktivierung des Immunsystems kommt es zur Ausbildung eines soliden Tumors. So ist der Hirntumor nach der Leukämie die zweithäufigste Tumorart bei Kindern (SIKORA et al., 1982). Die Tatsache, daß trotz bestehender Immunabwehr Tumoren entstehen, weist darauf hin, daß sich aus bis jetzt nur teilweise bekannten Gründen die Tumorzellen einer Vernichtung durch immunkompetente Lymphozyten (OETTGEN et al., 1971; STAVROU et al., 1977), entziehen können. Faktoren wie altersbedingte Immunschwäche, immunsuppressive Behandlung bzw. Bestrahlung (OETTGEN et al., 1971; WEISS, 1984), aber auch die Maskierung der Tumorzellen durch zirkulierende Antikörper oder die doch relativ geringe Antigenität der neoplastischen Zellen (PREHN, 1975; BALDWIN und PRICE, 1976; HEWITT et al., 1976; WEISS, 1977) spielen sicher eine entscheidende Rolle.

Die Annahme einer bestehenden zellulären und humoralen Immunantwort gegen Hirntumoren kann durch Serumuntersuchungen von Gliompatienten oder von mit Tumorzellen immunisierten Versuchstieren bestätigt werden. Durch die Vielzahl der Antigene, mit denen der jeweilige Organismus konfrontiert wird, sind solche in vivo gewonnenen Seren jedoch immer polyklonal. Als weitere Nachteile gelten die nur begrenzt zur Verfügung

stehende Serummenge und die Schwierigkeit, die spezifischen Immunglobuline zu isolieren.

Aus diesen Gründen gilt die von KÖHLER und MILSTEIN (1975) etablierte Hybridomtechnik als ein Verfahren, das die Tumorummunologie einen entscheidenden Schritt vorwärts brachte. Durch die Verschmelzung einer Plasmazytomzelle mit einer spezifisch sensibilisierten Milzzelle können Hybridome hergestellt werden, die nach verschiedenen Selektionsverfahren schließlich monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge abgeben. Durch dieses Verfahren wurden neue Wege in der Tumordiagnostik und in Zukunft möglicherweise auch in der Therapie gewiesen. Sollte es möglich sein, Antikörper zu entwickeln, die ausschließlich gegen Gehirntumorzellen gerichtet sind, könnte das zunächst für die Diagnostik, aber auch, gekoppelt an Radioisotope oder cytotoxische Stoffe (OLSNES und PIHL, 1982; VITETTA et al., 1983; BJORN et al., 1985) für eine gezielte Tumorthherapie von großem Nutzen sein.

B Literaturübersicht

1. Antigenität glialer Hirntumoren

Sowohl spontane als auch chemisch induzierte Hirntumoren exprimieren tumorassoziierte Antigene (HELLSTRÖM et al., 1971; OETTGEN et al., 1971; KLEIN, 1972; BALDWIN und PRICE, 1976), die in dem Gewebe, von dem der Tumor ausgeht, nicht anzutreffen sind (RUDDON, 1978; GREAVES und JANOSSY, 1978).

Den Ursprung dieser Tumorantigene erklärt man sich durch das Auftreten normaler genetischer Information in falschem zellulären oder zeitlichen Zusammenhang wie zum Beispiel fetale Antigene bei Erwachsenen (OETTGEN et al., 1971) oder durch Umordnung der normalen Zelloberflächenstrukturen (KENNETT et al., 1980).

Sowohl in bezug auf die Antigenität als auch auf die Immunogenität stellen sich die Hirntumoren als sehr heterogen dar (BIGNER et al., 1981; SHAPIRO, 1981; BIGNER, 1982); viele der Zelloberflächenmoleküle sind noch nicht identifiziert (BECHTOL et al., 1980a).

Der Organismus reagiert auf die Antigene mit einer zellulären und/oder humoralen Immunantwort (OETTGEN et al., 1971; STAVROU, 1976; WOOSLEY et al., 1977; WIKSTRAND et al., 1977; RAINBIRD und RIDLEY, 1977; STAVROU et al., 1977; SPENCE et al., 1979; COAKHAM et al., 1980; DE TRIBOLET und CARELL, 1980), wobei in jungen Tumorträgern mit Gliomen niedriger Malignität ein besonders hoher Antikörpertiter gefunden wurde (COAKHAM et al., 1980).

Durch die Anwesenheit von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen in Hirntumoren konnte auf eine mögliche zelluläre Immunabwehr geschlossen werden (RIDLEY und CAVANAGH 1971; STAVROU et al., 1977c, 1981). Die Infiltration des Tumors durch immunkompetente Zellen schien die Prognose der Erkrankung zu verbessern (OETTGEN, 1974).

Die Intensität der Immunantwort scheint primär unabhängig von der Malignität des Tumors zu sein (KORNBLITH et al., 1974). Die Tumorzellen haben offensichtlich verschiedene Möglichkeiten, sich der Vernichtung durch Lymphozyten zu entziehen ("Escape"-Mechanismen). Ein Faktor ist sicherlich die Schnelligkeit, mit der der Tumor sich im Gewebe ausbreitet (EGGERS et al., 1982), und die zunächst geringe, nur langsam ansteigende Menge des Antigens (PREHN, 1975; BALDWIN und PRICE, 1976; HEWITT et al., 1976; WEISS, 1977). Andere Faktoren sind ein von den Tumorzellen abgegebenes Mitoseinhibitor (ANDERSON et al., 1972), die Aktivität der antigenspezifischen Suppressorzellen (GERSHON et al., 1972; CANTOR und BOYSE, 1977; STAVROU et al., 1981), die Immunselektion, die einen Selektionsvorteil der am wenigsten antigenen Varianten innerhalb der heterogenen Tumorzellpopulation bedingt (HAUSCHKA et al., 1956; BOYSE und OLD, 1969), sowie allgemeine Faktoren wie altersbedingte Immunschwäche, genetische Defekte und Immunsuppression durch Chemotherapie und Bestrahlung (OETTGEN et al., 1971; WEISS, 1984).

2. Transplantationstumoren

Über die Möglichkeit, Zellen neurogener Tumoren in vitro am Leben zu erhalten, bestand schon 1925 (FISCHER, 1925; KIAER, 1925) kein Zweifel. 1961 hatte KERSTING mit seiner Explantierungsmethode bei 357 von 398 Hirngeschwülsten Erfolg und konnte wertvolle Erfahrungen in bezug auf Morphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und Anforderungen an das Nährmedium gewinnen, ebenso wie MANUELIDIS (1965) mit 42 von 163 intracranialen Tumoren.

Am Beispiel von zwei Colonkarzinomen zeigten WALTON et al. (1985), daß Tumoren, die zunächst in Nacktmäuse implantiert worden waren, sich nach einigen in vivo Passagen sicherer und erfolgreicher kultivieren ließen. RYGAARD et al. hatten diese Methode 1969 als erste beschrieben. GRANT et al. (1979);

MATTHEWS et al., (1982) bestätigten dieses Phänomen an Pankreas-, Blasen- und Nierentumoren. DAVIES et al., (1981) explantierten Tumoren des Verdauungstraktes erfolgreich in nackte Ratten und ermittelten, daß Maus-Ratte Wechselfassagen eines Colon- und eines Pankreascarcinoms die Etablierungsrate erhöhten, wobei durch SOUTHAM und BEUNSCHWIG (1961) die Mindestzahl von 10^7 Zellen für eine erfolgreiche Implantation experimentell ermittelt worden war.

Mit der Transplantation menschlicher Gliome und Meningeome machten GREENE und ARNOLD 1945 die ersten Versuche. Über eine erfolgreiche subkutane oder intrazerebrale Transplantation von Biopsiematerial humaner Gliome sowie Gliomzellen in die thymusaplastische Nacktmaus berichten BRADLEY et al., 1978; SHAPIRO et al., 1979; BULLARD und BIGNER, 1980; HORTEN et al., 1981; YAMASHITA et al., 1981 und JONES et al., 1981a.

Neben der höheren in vitro Etablierungsrate nach Tierpassagen besteht zusätzlich die Möglichkeit, am Versuchstier wachstumskinetische und immunologische Aspekte eines Tumors zu studieren, sowie den Effekt antineoplastischer Medikamente zu erforschen (BRADLEY et al., 1978; HERLYN et al., 1980a; HERLYN und KOPROWSKI, 1982a; HARANAKA et al., 1984).

Untersuchungen von PERESE und MOORE (1960) sowie von MANUELIDIS (1961) zeigten allerdings, daß transplantierte Tumoren des Zentralnervensystems in immundefizienten Tieren ihre histologischen Charakteristika ändern können. Der Beweis, daß die Tumoren auch nach der zehnten Tierpassage noch ausschließlich aus humanen Zellen bestanden, wurde mit einer Chromosomenanalyse erbracht (GRANT et al., 1979; DAVIES et al., 1981).

3. Immunisierungen

Seit KÖHLER und MILSTEIN (1975) die Methode entwickelten,

über die Fusion sensibilisierter Milzzellen mit Myelomzellen Hybride herzustellen, die die Eigenschaften ihrer "Elternzellen", nämlich Antikörperproduktion und die Fähigkeit als permanente Zellkultur zu wachsen, erbt, sind verschiedene Verfahren zur Sensibilisierung von B-Lymphozyten entwickelt worden.

Die Stimulierung kann in vivo über i.v., s.c. und i.p. Injektionen des Antigens in das Versuchstier erfolgen. Diese Methode ist von verschiedenen Forschungsgruppen mit unterschiedlichen Immunisierungsverfahren angewendet worden.

MINNA et al., (1981) immunisierten Mäuse mit Hilfe von sechs Injektionen lebender Lungencarcinomzellen im Abstand von je einer Woche. Die erste erfolgte s.c. in komplettem Freund'schen Adjuvans, das die Immunreaktion stimulieren sollte (BANSAL und SJÖGREN, 1973; WARNATZ, 1975), die nächsten fünf i.p. und die letzte drei Tage vor der Fusion. CARELL et al. (1982) hingegen immunisierten zweimal intraperitoneal mit Melanomzellen in komplettem Freund'schen Adjuvans und boosterten nach 20 Tagen. Die Fusion erfolgte drei Tage nach dem Boostern. FAZEKAS DE ST. GROTH und SCHEIDEGGER (1980a) immunisierten BALB/c Mäuse, indem sie ihnen 7-12 Wochen nach der Primärimmunisierung das Antigen (gereinigtes Influenzavirus) ein zweites Mal i.p. injizierten.

Auch durch die Immunisierung mit Glutaraldehyd-fixierten Neuroblastomzellen wurde eine Immunreaktion hervorgerufen, die sich allerdings, vermutlich durch die geringgradige Modifikation der Oberflächenantigene von der Immunisierung mit lebenden Zellen unterschied (BECHTOL et al., 1980a).

Die produzierten Antikörper sind, da sie von Maushybridomen sezerniert werden, für die Diagnostik erfolgreich, für die Therapie am Menschen jedoch nur begrenzt einsetzbar (CROCE et al., 1980).

Ein weiterer Nachteil dieser Verfahren ist, daß sich die sezernierten Antikörper nicht nur gegen das gewünschte Antigen, sondern auch gegen fremde Histokompatibilitätsantigene und Blutgruppenglycoproteine richten können (SIKORA et al., 1982).

Deshalb benutzte man als Produzenten humaner Antikörper in Humanfusionen entweder Zellen, die in Tumorpatienten "in vivo" immunisiert worden waren, oder man bediente sich verschiedener in vitro Immunisierungstechniken.

SIKORA et al. (1981) benutzten intratumorale Lymphozyten bzw. Lymphozyten aus einem Lymphknoten im Lymphabflußgebiet des Tumors, von SCHWABER und COHEN (1973), SCHWABER (1975) und CROCE (1980) wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut, von KAPLAN und OLSSON (1982) Milzzellen von Patienten mit Morbus Hodgkin und von STRIKE et al. (1984) Tonsillenlymphozyten als Fusionspartner verwendet.

Daneben wurden Versuche zur in vitro Immunisierung von Milzzellen und peripheren Lymphozyten gemacht (SHARMA, 1975 und 1976; EGGERS et al., 1980, 1982; OLSTADT et al., 1982; PARDUE et al., 1983).

4. Fusionen

Um antikörperproduzierende Hybridome zu erhalten, werden in der Regel durch ein Antigen sensibilisierte Splenozyten und teilungsfähige Myelomzellen zur Verschmelzung veranlaßt.

Die Spontanfusion zweier Körperzellen ist ein sehr seltenes Ereignis (BARSKI et al., 1961). Eine wesentliche Steigerung der Verschmelzungsrate kann bei Anwendung von Milzzellen hyperimmunisierter Tiere beobachtet werden (KÖHLER und SHULMAN, 1978). Aus diesem Grund ist eine Fusion am erfolgreichsten, wenn sie drei Tage nach dem Boostern stattfindet (OI et al., 1978).

Eine weitere Steigerung der Fusionsrate um das 10-100-

fache kann durch die Verwendung eines Fusionsvermittlers erreicht werden (YELTON et al., 1978).

Dazu wurde zu Beginn der Fusionsversuche das Sendaivirus verwendet (HARRIS und WATKINS, 1965). Da die Anwendung des Virus (SCHWABER, 1975) jedoch labortechnische Schwierigkeiten machte und nicht alle Zellarten Sendaivirusrezeptoren tragen (YELTON et al., 1980), wurde nach Versuchen mit einer Vielzahl von membranaktiven Substanzen Polyäthylenglycol (PEG, HO-(CH₃-CH₂)OH) verschiedener Molekulargewichte neben anderen wie Polyvinylpyrrolidone und Polyvinylalkohol als ideal angesehen (KLEBE und MANCUSO, 1981).

Nach der Präparation von Milzzellen wurden sie im Verhältnis 1:1 bis 10:1 (SIKORA et al., 1982; OLSSON und KAPLAN, 1983) mit Myelomzellen (STRIKE et al., 1984; WESTERWOUD et al., 1984) vermischt, zentrifugiert und mit PEG als Fusionsvermittler behandelt.

Die Mechanismen der Zellfusion sind nur teilweise bekannt. Auf eine enge Annäherung der Zellen in der Agglutinationsphase folgt eine Membranfusion an Stellen besonders engen Kontaktes mit nachfolgender Ausbildung einer oder mehrerer zytoplasmatischer Brücken (KNUTTON und PASTERNAK, 1979). Während bei der Sendaivirusbindung keine Modifikation der Membranstrukturen zu beobachten ist, schrumpfen die Zellen unter der Behandlung mit dem hygroskopischen PEG, verbunden mit einer Veränderung der Glycoproteinmoleküle der Zellmembran (KNUTTON und PASTERNAK, 1979). Danach folgt eine Zellschwellung, verursacht durch eine erhöhte Permeabilität der Zellmembranen und die Ausbildung einer zweikernigen Zelle. Die Kerne der fusionierten Zellen vereinigen sich durch gleichzeitige Mitose, und die Chromosomen werden in einem gemeinsamen Kern zusammengefaßt (AX, 1985). Das toxische PEG (SCHNEIDERMAN et al., 1979) wird durch Verdünnen und Zentrifugieren ausgewaschen (HELLSTRÖM et al., 1980).

5. Hybridome

Es sind Versuche zur Herstellung von Maus-Maus Hybridomen (HERLYN et al., 1979a; FAZEKAS DE ST. GROTH et al., 1980a; DIPPOLD et al., 1980; HELLSTRÖM et al., 1980; HERLYN et al., 1980b; KEMSHEAD et al., 1981b; SCHNEGG et al., 1981b; CAIRN-CROSS et al., 1982; STAVROU et al., 1983; COAKHAM et al., 1985); Ratte-Ratte Hybridomen (DEAN et al., 1982), Mensch-Mensch Hybridomen (OLSSON und KAPLAN, 1980a, 1980b; CROCE et al., 1980; SIKORA et al., 1982; OLSSON und KAPLAN, 1983; STRIKE et al., 1984), aber auch von Interspezieshybridomen wie Maus-Ratte (DÜRR, 1984), Maus-Mensch (Lit. bei SIKORA und PHILLIPS, 1981) gemacht worden. Die Interspezieshybridome Maus-Mensch neigen durch den fortschreitenden Verlust von humanen Chromosomen zur Instabilität (OLSSON und KAPLAN, 1980a) oder verlieren die Fähigkeit, spezifische Antikörper zu produzieren (CROCE et al., 1980).

Die fusionierten Zellen werden in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT-) Selektionsmedium auf "feeder-layer" wie Thymozyten (LEHNHARDT et al., 1978; HELLSTRÖM et al., 1980; SCHLOM et al., 1980; HASHIMOTO et al., 1981), unbehandelte Milzzellen (GALFRE et al., 1977; LEVY und DILLEY, 1978), Makrophagen (Lit. bei FAZEKAS DE ST. GROTH et al., 1980a), Rattenfibroblasten (Lit. bei DEAN et al., 1982) oder Mäusefibroblasten (KENNETT et al., 1978) ausgesät, wobei Makrophagen unter bestimmten Versuchsbedingungen ihrerseits zytotoxisch reagieren können (LOHMANN-MATTHES et al., 1973). Die Makrophagen nehmen zum einen Zelldetritus auf, der vor allem während der HAT-Selektion durch die absterbenden HAT-sensiblen Zellen in großen Mengen auftritt (BRODIN et al., 1983), und geben zum anderen für die Hybridome offensichtlich lebensnotwendige Faktoren in das Nährmedium ab (HENGARTNER et al., 1978; GODING, 1980). Das Absterben der nicht fusionierten Zellen

durch das HAT-Selektionsmedium (LITTLEFIELD, 1964) wird an Kontrollen, wie Myelomzellen oder Milzzellen, verfolgt. Um Hybridomkolonien nur aus jeweils einer Zelle zu erhalten, vereinzelt man die Zellen durch mehrere Klonierungen zum Beispiel nach dem Verfahren der "limiting dilution" (LEVKOVITZ und WALDMANN, 1979), dem "mini-cloning" (MINNA et al., 1981) oder dem Soft agar-Verfahren (COFFINO et al., 1972), wobei wegen der starken Zellvereinzellung bei "limiting dilution" "feeder-layer" oder konditioniertes Medium verwendet werden muß (PICKERING und GELDER, 1982).

Die Überstände der einzelnen Hybridomkolonien können auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen bestimmte Targetzellen mit der Indirekten Immunperoxidase-Färbung (IPF; NEXØ, 1977) und dem "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA; ENGVALL und PEARLMAN, 1979; DOUILLARD et al., 1980; LANSDORP et al., 1980; SUTER, 1980; POSNER et al., 1982), sowie der Indirekten Immunofluoreszenzmethode (IF; GODING, 1976; PARKS et al., 1979; REINHERZ et al., 1979; POSNER et al., 1982) und dem Radioimmunassay (RIA; STOCKER und HEUSSER, 1979; BECHTOL et al., 1980b; FISCHER und BROWN, 1980; KUMMER et al., 1981) getestet werden.

6. Monoklonale Antikörper

Das Verfahren, außerhalb des Organismus einen gegen einen Tumor gerichteten Antikörper in genügender Menge herzustellen, ist durch die von KÖHLER und MILSTEIN (1975) eingearbeiteten Techniken erst möglich geworden. Monoklonale Antikörper besitzen die von BOROWITZ und STEIN (1984) geforderten Eigenschaften, um diagnostisch und möglicherweise auch therapeutisch eingesetzt werden zu können, zum Beispiel zum Erkennen metastatischer Infiltrationen im Knochenmark (KEMSHEAD et al., 1981a), zur in vitro Analyse von Leukämie und Lymphom (BOROWITZ und STEIN, 1984), zum Erkennen eines bestimmten Zelldifferenzierungsgrades (BURTIN und NARDELLI, 1983), außerdem in der

Biochemie (EISENBARTH, 1981), Serologie und Immungenetik
(KENNETT und GILBERT, 1979).

C Problemstellung

Aus der Literatur, die in den letzten zehn Jahren über das Thema "Monoklonale Antikörper in der klinischen und experimentellen Onkologie" erschienen ist, geht deutlich hervor, wie vielschichtig und vielversprechend die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode bereits sind oder in Zukunft sein werden.

Wegen der Heterogenität glialer Hirntumoren besteht in der Diagnostik ein besonderes Bedürfnis nach spezifischen Molekülen zur Charakterisierung dieser Neoplasmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, durch die Fusion von Splenozyten hyperimmunisierter Mäuse, die gegen ein Astrozytom des Menschen immunisiert worden waren, mit der Mausmyelomzelllinie X63Ag8.653 (KEARNEY et al., 1979) nach der Methode von KÖHLER und MILSTEIN (1975) Immunglobulin produzierende Hybridome zu etablieren.

Durch die Austestung der Antikörper sowohl auf verschiedenen Tumortypen in Zellkultur, Paraffin- und Gefrierschnitt als auch auf adultem und fetalem Normalgewebe sollte ein Erkennungsmuster der monoklonalen Antikörper erstellt werden.

D Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten BALB/c Mäuse beiderlei Geschlechts, die unter gleichen Bedingungen in Macrolon^R Käfigen gehalten wurden. Daneben kamen weibliche und männliche thymusaplastische BALB/c-nu/nu Nacktmäuse zur Anwendung. Sie wurden bei 26-28°C Raumtemperatur und in keimarmer Umgebung unter Standardbedingungen (40-60% Luftfeuchtigkeit, 10-15facher Luftwechsel pro Stunde, 10 Stunden Beleuchtung pro Tag, ca. 97 cm² Bodenfläche pro Maus (FOGH und GIOVANELLA, 1978) gehalten. Alle Tiere erhielten Altromin^R als Diätfutter und Wasser ad libitum.

1.2. Tumormaterial

Die für die in vitro Züchtung verwendeten Tumorproben (Tab. 1) wurden als Operationspräparate von der Neurochirurgischen Abteilung des Krankenhauses München-Bogenhausen (Chefarzt Dr. F. Schmidtberger) zur Verfügung gestellt. Das neoplastische Gewebe wurde steril transportiert und zur Gewährleistung optimaler Zellvitalität innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet.

Tabelle 1: In vitro kultivierte Hirntumoren

Tumor Nr.	Patient	Diagnose	maximale Passage-Nr.	durchschnitt- liche Passage- zeit in Tagen	Kulturlebens- dauer in Tagen
1. N 22/85	E.S. w., 56 J.	Glioblastom	18	10,7	193
2. N 42/85	A.A. m., 48 J.	Astrozytom II	4	19	76
3. N 43/85	M.S. w., 40 J.	Glioblastoma multiforme	2	21,5	43
4. N 44/85	K.S. w., 50 J.	gemischtes Gliom II	5	20	100
5. N 47/85	R.R. w., 63 J.	Glioblastoma multiforme Rezidiv	1	31	31
6. N 48/85	K.W. m., 33 J.	Astrozytom III Rezidiv	3	16,6	50
7. N 49/85	O.S. m., 68 J.	Astrozytom III	2	12	24
8. N 53/85	A.G. m., 62 J.	Glioblastom	1	58	58
9. N 55/85	N.E. m., 55 J.	Oligodendrogliom III	1	36	36
10. N 58/85	J.H. m., 70 J.	Astrozytom III	8	14,6	117
11. N 61/85	R.H. w., 65 J.	Glioblastom Rezidiv	3	40	noch in Kultur
12. N 62/85	K.W. m., 33 J.	Glioblastom Rezidiv	6	24,8	noch in Kultur

Tabelle 1: In vitro kultivierte Hirntumoren (Fortsetzung 1)

Tumor Nr.	Patient	Diagnose	maximale Passage-Nr.	durchschnitt- liche Passage- zeit in Tagen	Kulturlebens- dauer in Tagen
13. N 67/85	H.L. m., 54 J.	Astrozytom III	0	-	56
14. N 68/85	A.M. w., 71 J.	Astrozytom III	3	34	noch in Kultur
15. N 69/85	E.F. w., 60 J.	Astrozytom IV	4	26,2	noch in Kultur
16. N 70/85	G.D. w., 14 J.	Oligodendrogliom IV	4	24,5	noch in Kultur
17. N 71/85	A.G. m., 61 J.	Glioblastom/ Fibrosarkom	2	18	noch in Kultur
18. N 72/85	K.S. m., 52 J.	Astrozytom	2	45	noch in Kultur
19. N 73/85	R.S. w., 55 J.	Glioblastom Rezidiv	4	17	noch in Kultur
20. N 74/85	S.S. w., 51 J.	Astrozytom IV	3	26	noch in Kultur
21. N 1/86	O.S. m., 69 J.	Astrozytom II-III	0	-	20
22. N 3/86	E.S. w., 57 J.	Glioblastom/ Fibrosarkom	2	33,5	noch in Kultur
23. N 13/86	K.F. m., 67 J.	Astrozytom III	2	6	18
24. N 16/86	E.S. w., 57 J.	Glioblastom	4	8	40

Tabelle 1: In vitro kultivierte Hirntumoren (Fortsetzung 2)

Tumor Nr.	Patient	Diagnose	maximale Passage-Nr.	durchschnitt- liche Passage- zeit in Tagen	Kulturlebens- dauer in Tagen
25. N 17/86	H.J. m., 47 J.	Astrozytom	1	16	24
26. N 18/86	J.S. m., 56 J.	Glioblastom	10	18	noch in
27. N 20/86	G.B. m., 32 J.	Oligodendrogliom	1	20	30
28. N 21/86	R.B. w., 65 J.	Astrozytom III	3	6	31
29. N 23/86	M.P. w., 61 J.	Glioblastom	2	8	24
30. N 24/86	A.G. m., 51 J.	Oligodendrogliom	4	28	noch in Kultur
31. N 28/86	M.S. w., 69 J.	Astrozytom III	4	4	24
32. N 29/86	H.K. m., 53 J.	Glioblastom	10	8,5	noch in Kultur
33. N 30/86	D.T. m., 48 J.	Astrozytom III	2	40	noch in Kultur
34. N 31/86	T.J. m., 66 J.	Glioblastom	1	11	28
35. N 32/86	M.S. w., 69 J.	Astrozytom III	1	45	noch in Kultur
36. 33/86	A.K. m., 50 J.	Glioblastom	2	42	noch in Kultur

Zur Vorabklärung des histologischen Geschwulstcharakters wurde ein Gefrier-Schnellschnitt angefertigt und dieser nach der Haematein-Eosin-Methode gefärbt. Zur Konservierung und späteren Paraffineinbettung wurden je nach Größe des Tumors ein oder mehrere Gewebstücke jeweils in 0,5%iges Formalin, in Bouin'sche Lösung (1 ml Eisessig, 5 ml Formalin, 15 ml Pikrinsäure) und in Fixierungslösung nach Karnovsky eingelegt. Des weiteren wurden ein oder mehrere Tumorstücke steril in Cryotubes 1,8 ml (NUNC^R) überführt und bei -30°C eingefroren. Zur Anzüchtung wurde ein ca. 1 cm³ großes, makroskopisch nekrosefreies Geschwulstteil verwendet.

1.3. Zellmaterial

1.3.1. Tumorzellkulturen

1.3.1.1. Primärkulturen

Die Tumorzellkulturen wurden entsprechend der mechanischen Gewebedissoziationsmethode (PAUL, 1980) bzw. der Explantationsmethode (PAUL, 1980) in NUNC^R-Plastikflaschen (50 ml) angelegt. Als Anzuchtmedium diente M 199 (Seromed^R), das neben 20% fetalem bovines Serum (FBS) 100 000 IE Penicillin G, 0,1 g Streptomycin, 0,1 g Neomycin und 3,4 ml einer 200 mM Glutaminlösung pro Liter enthielt. Eine Hälfte der Zellkulturflaschen wurde in geschlossenem System bei 37°C bebrütet, die andere im offenen System in einer 6%igen CO₂ Atmosphäre mit 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 4-6 Tagen waren in der Regel die ersten Zellaussprossungen zu beobachten.

Danach wurde der Gehalt an fetalem bovines Serum in drei Schritten von 20% auf 10% gesenkt; nach ca. 14 Tagen wurde in mehreren Stufen das Nährmedium M 199 durch RPMI 1640 ersetzt, das, mit Ausnahme des Glutamins (10 ml), die gleichen Zusätze wie das Anzuchtmedium enthielt.

1.3.1.2. Subkulturen

Die Zellen der Primärkulturen wurden entsprechend ihres Wachstumsverhaltens in regelmäßigen Abständen nach dem Trypsinierungsverfahren 1:2 bis 1:10 geteilt.

1.3.1.3. Konservierung von Zellen

Sowohl Tumor-, Myelom- als auch Hybridomzellen wurden in regelmäßigen Zeitabständen unter Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) zum Nährmedium eingefroren. Die Tumorzellen wurden dazu nach dem Trypsinierungsverfahren abgelöst, zentrifugiert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml im Einfriermedium (RPMI 1640 mit den oben genannten Antibiotika-Zusätzen, 20% fetalem bovines Serum und 10% DMSO) aufgenommen, zu 1,3 ml Portionen in 1,8 ml Cryotubes (NUNC^R) verbracht, 4 Stunden bei 4°C gelagert und dann bei -90°C tiefgefroren (ASHWOOD-SMITH, 1961).

Das Auftauen erfolgte schockartig (1 Min.); im Medium befindliches DMSO wurde durch Zentrifugieren entfernt.

Zum Konservieren von Hybridomzellen in Vertiefungen von Linbro-Platten (ca. 10^5 - 10^7 Zellen pro Vertiefung) kam folgendes Verfahren (DE LEIJ et al., 1983) zur Anwendung: Das über den Zellen stehende Nährmedium wurde abgesaugt und durch 1,5 ml einer Einfrierflüssigkeit, bestehend aus 40% des verwendeten Nährmediums, 10% DMSO und 50% fetalem bovines Serum ersetzt. Danach wurde die Platte mit einem Plastikfilm verklebt und in eine zimmerwarme Styropor^R-Box mit 10 cm Wandstärke verbracht, die ebenfalls fest verschließbar war. Sodann wurde diese in einem Gefrierschrank einer Temperatur von -90°C ausgesetzt. Nach ca. 6 Stunden hatte ein Ausgleich zwischen der Innentemperatur des Gefrierschranks und der der Schachtel stattgefunden, und die Umhüllung konnte entfernt werden.

Bei Bedarf wurden die Zellen schockartig aufgetaut, das Gefriermedium nach dem Absetzen der Zellen auf den Boden der Vertiefung durch Absaugen entfernt und durch Kulturmedium ersetzt.

Sowohl eingeeingte Hybridomkulturüberstände als auch Ascites-Flüssigkeit wurden zur Konservierung bei -20°C eingefroren oder mit 0,02% Natriumazid (NaN_3) versetzt und bei 4°C gelagert (FEY et al., 1976; GODING, 1980).

1.3.1.4. Darstellung der Zellmorphie

Für die zellmorphologischen Untersuchungen wurden Tumorzellen verschiedener Passagen auf Lab-Teks^R (Miles Scientific, Bayer Diagnostik, München) ausgesät und nach einigen Tagen Inkubationszeit im Stadium der Subkonfluenz mit Haematoxin-Eosin gefärbt. Dazu wurde das Plastikgitter vom Glasobjektträger abgelöst, dieser 3 x 5 Minuten in PBS-A (Ca^{++} und Mg^{++} -freie Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2) gewaschen, anschließend wurden die Tumorzellenmonolayer in Bouin'scher Lösung 30 Minuten fixiert. Nach einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 96%, 70%, 70%) erfolgte ein Färbevorgang von 30 Min. in Haemalaun, dem sich ein 30minütiges Bläuen unter fließendem Wasser anschloß. Danach wurde mit 0,5%igem Eosin 1 Min. gegengefärbt und vor dem Eindecken mit Eukitt in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert.

1.3.1.5. Konditioniertes Medium

Zur Verbesserung der Kulturbedingungen wurden dem Standardmedium einiger Zellkulturen bis zu 20% eines konditionierten Mediums (CHEN et al., 1975) zugefügt. Hierbei handelte es sich um den Überstand sehr gut wachsender konfluenter Tumorzellkulturen, der gesammelt und zentrifugiert wurde, um freischwimmende Zellen zu entfernen. Daraufhin wurde er mehrmals bei -30°C eingefroren und wieder aufgetaut (CHEN et al., 1975),

um, nach der Inkubation einer Probe für 2 Tage bei 37°C zur Sterilitätskontrolle, dem Kulturmedium zugegeben werden zu können.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit wurden Parallel-Kulturen ohne Zusatz von konditioniertem Medium angelegt.

1.3.1.6. Behandlung von Gliomzellen mit db-cAMP

Das zyklische Adenosin-3'5'-Monophosphat regelt wichtige Lebensfunktionen der Zelle (MEDERSPACH und PARKAS, 1973). Deshalb hat die Zugabe eines Nukleotid-Derivates dieses Stoffes in das Zellkulturmedium Auswirkungen auf Wachstumsverhalten und Zellmorphie (McINTYRE und WINTERSGILL, 1972). Zur Untersuchung des Einflusses von N_6O_2 -Dibutyryl-Adenosin-3'5'-Monophosphat-Natriumsalz auf Tumorzellen in Kultur wurde aus 50 mg des db-cAMP und 4 ml aqua bidest. eine 0,25 mM Stammlösung hergestellt, diese mittels eines Millipore-Filters steril filtriert und zur Konservierung bei -20°C eingefroren.

Auf Lab-Teks^R semikonfluent gewachsenen Kulturen von Gliomzellen wurden mit 0,2 ml der 0,25 mM Lösung in 5 ml Medium überschichtet. Die Auswirkungen der Behandlung wurden nach 8, 12 und 24 Stunden beurteilt, die Kulturen fixiert, gefärbt und mit unbehandelten Kontrollkulturen verglichen.

1.3.2. Myelomzellen

Als Fusionspartner der Milzzellen kamen die Myelomzellen X63-Ag8.653 (KEARNEY et al., 1979) zur Anwendung. Sie sezernieren im Gegensatz zur Ursprungslinie X63-Ag8, von der sie einen Subklon darstellen, keine nachweisbaren Mengen an Immunglobulinen mehr.

Die in Suspension wachsenden Zellen besitzen 53 Chromosomen, sind Azaguanin-resistent, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-negativ und somit in HAT-Medium

(Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) nicht lebensfähig.

Die Myelomzellen wurden bei 37°C im offenen System bebrütet und alle 4-6 Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt.

Für die Fusionen wurden nur Zellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

1.3.3. Makrophagenpräparation

3-7 Tage vor ihrer Verwendung erhielten adulte BALB/c Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 1,5 ml sterilem 10%igem Thioglycollate (Difco Lab. Detroit, Michigan, USA; SCHIMMELPFENG et al., 1980).

Um die Ausbeute an Peritonealmakrophagen zu erhöhen, sollte das Medium vor Gebrauch 2-3 Monate bei Zimmertemperatur gelagert werden (MISHELL und SHIIGI, 1980).

Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert und durch Genickdislokation getötet. Danach wurden sie in 70%igen Alkohol getaucht und auf eine Korkplatte gespannt.

Von einem Einschnitt an der Kniefalte aus wurde die Bauchhaut mit einer Pinzette nach cranial gezogen. Nun wurden 5 ml eines Standardmediums durch eine weiträumige Kanüle (0,9 mm x 3,8 mm) in die Peritonealhöhle injiziert, mehrmals vorsichtig gespült und wieder aufgesaugt. Die Zellsuspension wurde in ein gekühltes konisches Reagenzglas gefüllt und für 10 Min. bei 200 g zentrifugiert.

Anschließend wurde die Zelldichte mit Zellkulturmedium auf 1×10^6 Makrophagen/ml eingestellt. Für eine ausreichende Dichte des "feeder-layer" bedurfte es pro Vertiefung einer Mikroplatte 10 μ l (1×10^4 Zellen), pro Vertiefung einer 24-Loch Linbroplatte 100 μ l (1×10^5 Zellen) und je 50 ml Zellkulturflasche 1 ml (1×10^6 Zellen) dieser Zellsuspension.

1.3.4. Fetale Zellen

Zur Gewinnung von fetalen Hirnzellen wurden zwei Embryonen (9. Schwangerschaftswoche) unter sterilen Bedingungen der größte Teil der Hirnanlage entnommen und das erhaltene Material nach der Gewebedissoziationsmethode (PAUL, 1980) bzw. der Explantationsmethode (PAUL, 1980) weiterverarbeitet. Auf die gleiche Weise wurden Zellkulturen vom gesamten Embryo bzw. verschiedener Körpersegmente angelegt. Das restliche Material wurde in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die von diesem Material angefertigten mit Chromgelatine aufgezogenen Schnitte wurden zum Spezifitätstest von Hybridomüberständen mittels der Indirekten Immunperoxidase-Reaktion herangezogen. Eine Färbung zur Darstellung von GFAP und S 100 sowie eine HE-Färbung sowohl von Schnitten als auch von Zytospin-Präparaten der Einzelzellen erfolgte gleichfalls.

1.4. Nachweis der gliaassoziierten Antigene GFAP und S 100

Zur Charakterisierung der etablierten Kulturen und der Tumoren als Gewebeschnitte wurden die Markerproteine GFAP ("glial fibrillary acidic protein") und S 100 ("soluble in 100% ammoniumsulfate") durch die Peroxidase/Antiperoxidase (PAP)-Reaktion sichtbar gemacht.

Nach dem Entparaffinieren der Paraffinschnitte in Xylol, der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) und aqua dest. erfolgte dann sowohl bei Gewebsschnitten als auch bei Zellkulturen ein 5minütiges Bad in H_2O_2 (7,5%) zum Blockieren der endogenen Peroxidase mit anschließendem Wässern in aqua dest. Danach wurden die Schnitte 5 Min. 2,28%iger wässriger Perjodsäure ausgesetzt, die vor einem 2minütigen Bad in 0,02%iger wässriger Natrium-Borhydridlösung mit aqua dest. entfernt wurde. Nach drei Spülgängen von je 15 Minuten in PBS ("phosphate buffered saline") wurden die vorsichtig

abgetrockneten Objektträger mit Normalserum betropft, das 5 Min. in feuchter Atmosphäre einwirkte. Wiederum 3 x 15 Min. in PBS gespült, wurden die Schnitte mit spezifischem polyklonalem Serum (Anti-GFAP bzw. Anti-S-100-Immunglobulin) überschichtet und über Nacht (ca. 16 Stunden) in einer feuchten Kammer bei Kühlschranktemperatur (4°C) inkubiert.

Nach drei 15minütigen Spülgängen in Brij-Lösung (0,5 ml 1%iges Brij auf 100 ml PBS) erfolgte die Färbung in AEC-Färbelösung (20 mg Aminoäthylcarbazol (Sigma, München)/12 ml Dimethylsulfoxid ad 100 ml Barbitalpuffer, 10 µl H₂O₂, 30%) und nach dem Spülen in aqua dest. und dem Gegenfärben in Haematein das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte wurden mit 30-60°C temperierter Kaiser's Glycerin-gelatine eingedeckt und nach dem Trocknen mit Zaponlack abgedichtet, um das Eindringen von Luft zu verhindern.

1.5. Nachweis von gliomassoziiertem Antigen mittels der Immunofluoreszenz

Je nach Wachstumsverhalten wurden die Testzellen 2-3 Tage vor Versuchsbeginn in Leighton-tubes ausgesät. Zur Immunfluoreszenz wurden native und fixierte subkonfluente Zellkulturen verwendet. Vier Fixierungsverfahren kamen zur Anwendung:

- | | |
|----------------------------|--------|
| a) Aceton, 4°C | 3 Min. |
| b) Glutaraldehyd, 5,25%ig, | 5 Min. |
| c) Formalin 6%ig in PBS-A, | 5 Min. |
| d) Bouin'sche Lösung | 5 Min. |

Danach wurden die Zellen einmal mit PBS-A gespült, der Hybridomüberstand auf die fixierten und unfixierten Zellen aufgetragen und bei 37°C 30 Min. in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Entfernen des ersten Antikörpers wurde 3 x 5 Min. mit PBS-A gewaschen und danach der zweite Antikörper (1:10 verdünntes Fluoreszinsisothiocyanat-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin; Dako, Kopenhagen; Sandwich Technik nach

COONS et al., 1957) aufgetragen und wiederum bei 37°C in feuchter Kammer 30 Min. inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS-A wurden die Lamellen in gepuffertem Glycerol eingeschlossen und ausgewertet. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Myelomüberstand inkubiert worden waren.

1.6. Transplantation von Tumoren

Um die Tumorigenität von humanen Gliomen in BALB/c-nu/nu-Nacktmäusen zu ermitteln, wurden Tumorzellen bzw. Tumorstückchen von Stecknadelkopfgröße implantiert.

Die in Kultur wachsenden Zellen wurden abtrypsiniert, bei 800 g 5 Min. zentrifugiert und je 1×10^6 Zellen wurden in 0,2 ml PBS-A resuspendiert. Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert, und die Zellsuspension intraperitoneal oder subcutan zwischen den Schulterblättern oder seitlich am Thorax deponiert. Zur Implantation von Tumorgewebsstückchen wurden diese auf eine Größe von ca. 1 mm^3 zurechtgeschnitten. Die Maus wurde mit 0,2 ml einer Lösung aus Rompun/Ketanest i.m. narkotisiert, und das Tumorstück durch einen 5 mm langen Hautschnitt mit einer feinen Pinzette subcutan geschoben. Die Wunde wurde mit einem Knopfheft vernäht.

Ein Teil der für Transplantationsversuche vorgesehenen Mäuse war drei Tage vor der Injektion/Implantation mit 0,3 ml Dexametason und 0,1 ml Cyclosporin A zur Immunsuppression vorbehandelt worden. Die Behandlung wurde am 3., 6. und 9. Tag wiederholt.

1.7. Immunisierungen

Zur Immunisierung wurden weibliche und männliche BALB/c Mäuse verwendet, die dreimal im Abstand von 20 bzw. 24 Tagen eine Injektion erhielten. Nach einer Ruhezeit von 65 Tagen wurde geboostert, und drei Tage später erfolgte die Fusion (Tab. 2).

Tabelle 2: Immunisierungsschema

		Grundimmunisierung		Boostern	Fusion
Tag	1	21	45	110	113
Antigen	5 x 10 ⁶ TNBS modifizizierte Zellen N 22/85	5 x 10 ⁶ native Zellen N 22/85	5 x 10 ⁶ native Zellen N 22/85	5 x 10 ⁵ native Zellen N 22/85	1 25 1
Ort der Immunisierung	intraperitoneal	subcutan, interscapulär	subcutan, interscapulär	intrasplenal	

Bei der Immunisierung erhielten die Mäuse entweder native oder chemisch modifizierte Zellen bzw. Zellfragmente. Die dichtgewachsenen Tumorzellmonolayer wurden mit der Trypsinierungsmethode abgelöst, zentrifugiert, der Pellet mit 0,1-0,2 ml sterilem PBS-A resuspendiert und injiziert. Die chemische Modifikation mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS; Sigma, München; LEMONNIER et al., 1977; STAVROU et al., 1981) erfolgte zur Steigerung der Antigenität. Eine 10 mM TNBS-Lösung entstand durch Lösen von 2,932 g TNBS in 1000 ml eines 0,05 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,4).

Es wurden sowohl kultivierte Zellen als auch Zellen aus dem Gewebeverband (Operationspräparate) modifiziert. Letztere entstanden durch Einfrieren eines ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm messenden Tumorstücks bei -30°C . Nach dem Auftauen wurde das Material durch ein Edelstahlsieb mit der Maschenweite $7\text{ }\mu\text{m}$ gedrückt, die Zellen im Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen in PBS-A auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium eingestellt, mit 1 ml der temperierten TNBS-Lösung vermischt, 10 Min. bei 37°C inkubiert und danach so lange mit PBS-A gewaschen, bis der Überstand farblos war. Die injizierte Zellsuspension enthielt je bis 5×10^6 Zellen und wurde entweder subcutan seitlich am Thorax oder interscapulär oder aber intraperitoneal injiziert. Die intrasplenale Immunisierung bzw. Boosterung erfolgte nach der Methode von GEARING et al., (1984) und SPITZ et al., (1984) mit je 5×10^5 Zellen.

1.8. Fusionen

a) Fusionspartner

Die Fusionen fanden zwischen der Mausmyelomzelllinie X63-Ag8.653 und Splenozyten einer mit Gliomzellen immunisierten Maus statt. Als Fusionsvermittler diente Polyäthylen-

glycol (MG 1500, PEG, Boehringer Ingelheim) (Abb. 1).

b) Myelomzellen

Es wurden für eine Fusion nur Myelomzellen verwendet, die sich in logarithmischer Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden gesammelt, in konisierte Zentrifugengläser transferiert, 10 Min. bei 800 g zentrifugiert und mit Kulturmedium auf eine Dichte von 10^7 Zellen/ml Medium eingestellt. Ein Teil der Myelomzellen wurde zurückbehalten, um als Testzellen für die HAT-Selektion zu fungieren.

c) Milzzellen

Die immunisierte Maus wurde in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, mit einer Schere grob zerkleinert und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein Sieb mit $60\text{ }\mu\text{m}$ Porenweite gedrückt, wobei ständig Kulturmedium zugetropft wurde.

Der Überstand wurde bei 800 g 10 Minuten zentrifugiert. Die Zelldichte wurde ebenfalls auf 10^7 Zellen pro ml eingestellt.

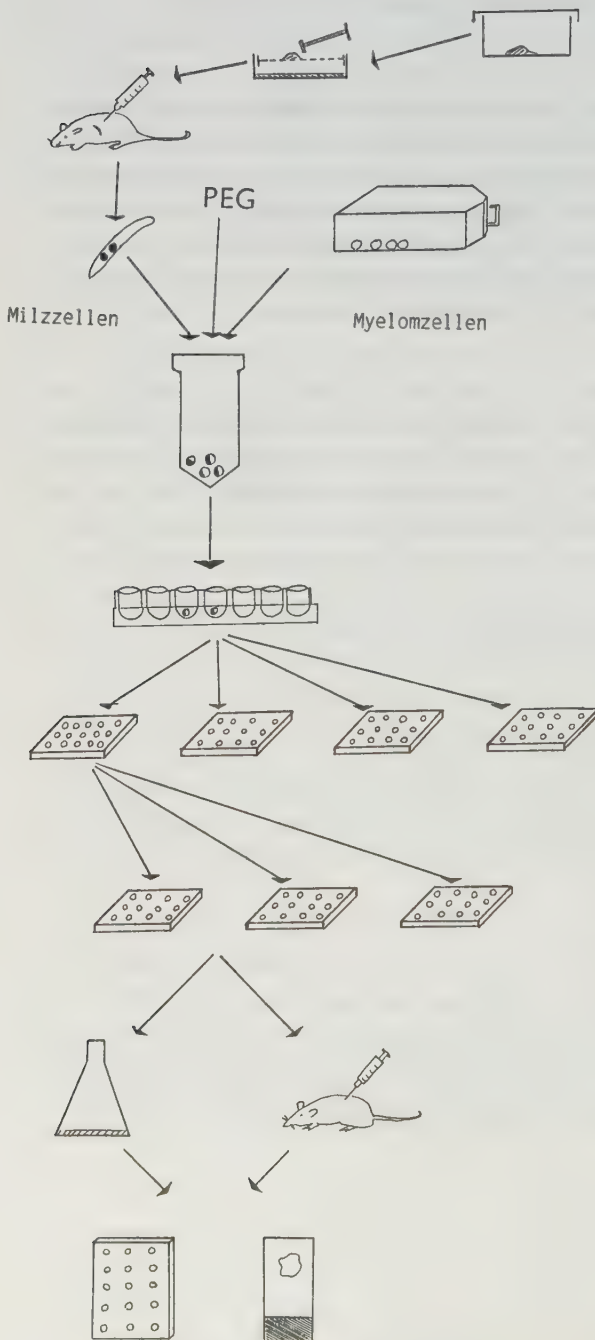
d) Vereinigen der Fusionspartner

Die Milzzellen wurden mit den Myelomzellen im Verhältnis 6:1 vermischt, diese Suspension 1-2mal mit einer Pasteurpipette suspendiert und bei 700 g 8 Min. zentrifugiert.

e) Behandlung mit PEG

Der Mediumüberstand wurde vorsichtig abgesaugt. Während einer Minute wurde 1 ml 50%iges PEG (MG 1500), bestehend aus einem Volumenanteil 75 mM Hepespuffer und einem Volumenanteil sterilem Polyäthylenglycol (MG 1500), auf den Pellet getropft und ein- bis zweimal vorsichtig mit einer Pasteurpipette

Abbildung 1: HYBRIDOMTECHNIK



Immunisierung mit Tumorzellen

Boostern (intrasplenal)

Fusion mit Polyäthylen-
glycol (MG 1500)

in vitro Kultivierung in
Selektionsmedium

Test der Überstände

Klonierungen

Test der Überstände

10:1 Einengung der Überstände

Produktion von Ascites-
flüssigkeit

Spezifitätstest

suspendiert. Nach einer Minute Reaktionszeit in einem Wasserbad von 37°C wurden bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Minuten 1 ml des Fusionsmediums, bestehend aus 97,45 ml des Grundmediums (450 ml Dulbecco's Medium, 50 ml Gibco NCTC 135, 5 ml Aminopterin), 2,2 ml Na-Pyruvat und 0,35 ml Na-EDTA hinzugefügt, danach während 3 Minuten 2 ml des serumfreien Fusionsmediums.

Darauf folgte innerhalb von 5 Minuten die Zugabe von 4 ml serumhaltigen Mediums, bestehend aus 450 ml Dulbecco's Medium (Flow Lab., Meckenheim), 50 ml Gibco NCTC 135, 100 ml fetalem bovinen Serum, 5 ml Na-Pyruvat, 1 ml Hypoxanthin/Thymidin und 5 ml Aminopterin.

Die Zellsuspension wurde anschließend bei 700 g 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und der Pellet in 10 ml Fusionsmedium mit Serum vorsichtig resuspendiert. Zur Stabilisierung wurde das Reagenzglas in einem Brutschrank mit 5% CO₂-Begasung verbracht. Dort erfolgte eine Inkubation von 1 Stunde bei 37°C. Danach wurden die Zellen auf eine Endmenge von 240 ml in HAT-Medium verdünnt und gleichmäßig auf 5 Linbro^R-Platten mit je 24 Löchern verteilt. Auf diese waren am Vortag 1 x 10⁵ Mäuseperitonealmakrophagen pro Vertiefung als "feeder-layer" ausgesät worden. Einige Vertiefungen erhielten statt der fusionierten Zellen die unbehandelten Myelomzellen zur Kontrolle der HAT-Selektion. Das HAT-Medium bestand aus DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") mit 20% fetalem bovinen Serum, 10 ml 8,8%igem NaHCO₃, 100 000 I.E. Penicillin, 0,1 g Streptomycin, 0,1 g Neomycin, 10 ml einer 0,04 mM Aminopterinlösung (Sigma, München) und 10 ml einer 10 mM Hypoxanthin-1,6 mM Thymidinlösung (Sigma, München).

Die Bebrütung erfolgte bei 37°C, maximaler Luftfeuchtigkeit und 6%iger CO₂-Atmosphäre. Der erste Mediumwechsel wurde nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen durchgeführt. Sobald die Hybridomzellen ausreichend dichtgewachsen waren, wurden

die Überstände einem Indirekten Immunperoxidase-Test unterzogen. Bei positivem Ergebnis wurden die entsprechenden Zellen kloniert.

Nach 3-4 Wochen waren in der Kontrollreihe keine Myelomzellen mehr am Leben, und das HAT-Medium konnte durch DMEM ersetzt werden (Tab. 3).

1.9. Nachweis von Immunglobulinen im Zellkulturüberstand

1.9.1. Mikro-ELISA

Zum Testen einer größeren Anzahl von Hybridomüberständen in Mikrottestplatten ist der mikro-ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") besonders gut geeignet (DOUILLARD et al., 1980).

Dazu wurden von der gewünschten Tumorzellkultur am Vortag des Testes 15 000 Zellen pro Vertiefung einer Mikrottestplatte ausgesät und nach einer Kultivationsdauer von 12-16 Stunden mittels PBS-A/5% FBS gespült. Danach folgte eine 10 Minuten dauernde Trocknungszeit. Diese Mikrottestplatten konnten ohne Verlust der Qualität bei -30°C längere Zeit gelagert werden. Die Zellen wurden dann vor dem Einfrieren mit Glutaraldehyd fixiert (LANSDORP et al., 1980) und für 60 Minuten mit 10%igem Schweineserum (in PBS-A) inkubiert.

Nach dem Auftauen und Dekantieren des Schweineserums konnten sie in gleicher Weise genutzt werden wie frisch mit Methanol/Aceton fixierte.

Als negative Kontrolle des Testes diente der Überstand der Myelomzellen X63-Ag8.653, als positive die 1:100 verdünnte Ascitesflüssigkeit aus Mäusen, denen Hybridomzellen intraperitoneal injiziert worden waren. Nach einer 30minütigen

Tabelle 3: Fusionsprotokoll

Tag der Fusion	113. Tag nach dem ersten Teil der Grundimmunisierung
Myelomzelllinie	X63-Ag8.653
Fusionspartner	3×10^7 Myelomzellen 12×10^7 Milzzellen
Verhältnis Milzzellen:Myelomzellen	4:1
Fusionsvermittler	Polyäthylenglycol (PEG), Molekulargewicht 1500
PEG Einwirkzeit/Temperatur	2 min/37°C
Arbeitstemperatur	Raumtemperatur
Stabilisierungszeit	60 min
"feeder-layer"	Mäuseperitonealmakrophagen
Hybridomwachstum	nach 4 Tagen
HAT-Selektion beendet	nach 13 Tagen

Inkubationszeit des unverdünnten Überstandes (50 μ l pro Vertiefung) bei 4°C folgten drei Spülgänge mit PBS-A/5% FBS. Danach wurden die Zellen mit je 50 μ l/Vertiefung des zweiten Antikörpers überschichtet, der für eine Platte aus 0,25 ml FBS, 5,0 ml PBS-A und 0,05 ml Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen) zusammengesetzt war. Die erste Reihe der Platte wurde nur mit PBS-A überschichtet und diente als Leerwert.

Die Inkubation bei 4°C dauerte 30 Minuten. Nun folgten je drei Waschvorgänge mit PBS-A/5% und reinem PBS-A.

Um die Reaktion sichtbar zu machen, wurden in jede Vertiefung nun 100 μ l des Substrates pipettiert, das für eine Platte aus 10 mg ortho-Phenylendiamin (Sigma, München), 10 ml Citratpuffer (pH 4,5) und 40 μ l H₂O₂ 30%ig bestand. Die Extinktion wurde nach einer bei Raumtemperatur erfolgenden Inkubationszeit von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 492 nm mit dem Photometer Titertek^R, Multiscanner MC (Flow Lab., Bonn) abgelesen. Als positiv galten die Werte, die den fünffachen Negativkontrollwert deutlich überschritten.

1.9.2. Indirekter Immunperoxidasetest

1.9.2.1. Mikrotestplatten

Der indirekte Immunperoxidasetest auf Mikrotestplatten eignete sich besonders zum Testen kleinerer Mengen von Hybridomüberständen. Je nach Wachstumskapazität des Tumors wurde 36-48 Stunden vor dem Test eine Suspension der gewünschten Targetzellen auf eine Konzentration von 25 000 Zellen/ml des Kulturmediums eingestellt und je 20 μ l dieser Suspension auf die Vertiefungen der Platte verteilt. Das entsprach einer Anzahl von 500 Zellen pro Vertiefung (PATERAKI, 1981).

Die Platten wurden im offenen System bei 37°C, 95% Luft-

feuchtigkeit und 5%iger CO_2 -Atmosphäre bis zur Semikonfluenz inkubiert, dann wurde das Medium dekantiert und die Platten mit PBS-A (4°C) gewaschen. Die Fixation erfolgte mit Methanol/Aceton 1:1 (4°C), das auf die Zellen gegeben, danach sofort abgekippt und ein weiteres Mal auf die Platte pipettiert wurde, wo es 5 Minuten einwirkte. Nach dem Dekantieren erfolgte eine 10-15 Minuten dauernde Lufttrocknung. Nach diesem Schritt können die Platten ohne Verlust der Testempfindlichkeit bei -20°C eingefroren werden.

Nach der Fixation bzw. dem Auftauen der Platten wurden je $20\text{ }\mu\text{l}$ des unverdünnt anzuwendenden Überstandes auf die Zellen gegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach weiterem sechsmaligen Waschen mit dazwischenliegender 10minütiger PBS-A Inkubation wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper überschichtet. Dieser bestand aus 0,25 ml FBS, 5 ml PBS-A und 0,05 ml Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen) pro Platte.

Nach einer Bebrütung von 60 Minuten und einem weiteren Spül- und Inkubationsvorgang mit PBS-A erfolgte die Sichtbarmachung der Reaktion durch einen Färbevorgang mit dem Substrat nach NEXØ (1977). Letzteres besteht aus 4 mg 3-Amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma, München), gelöst in 1,25 ml Dimethylformamid (N-N-DMFA; Merck, Darmstadt), aufgefüllt mit 19 ml Acetatpuffer (pH 5,0) pro Platte. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ 30%iges Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) dazugegeben.

Nach einer Zeitspanne von ca. 10 Minuten wurde die Anfärbung der Zellen durch gründliches Spülen mit deionisiertem Wasser unterbrochen, und die Platten mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Es wurden folgende Anfärbungsstufen unterschieden: negativ (-), schwach (+), mittelgradig (++) und stark (+++) positive Reaktion. Als positiv galten die-

jenigen Vertiefungen, in denen die Mehrzahl der Testzellen eine rot-bräunliche Anfärbung ihrer Membranen aufwies. Als negative Kontrolle diente der Myelomzellüberstand, als positive diente 1:100 verdünnte Ascitesflüssigkeit.

1.9.2.2. Gewebeschnitte

Um die Spezifität der von den Hybridomen produzierten Antikörper zu testen, wurden Immunperoxidasetests sowohl auf Gefrier- als auch auf Paraffinschnitten durchgeführt. Das Material stammte aus Operationspräparaten und wurde nach der vorläufigen Diagnosestellung an Hand eines Gefrierschnellschnittes mit HE-Färbung in Bouin, Methanol/Aceton oder Karnovsky-Fixierungslösung fixiert. Daneben kamen native oder mit kaltem Aceton (4°C) fixierte Gefrierschnitte zur Anwendung.

Die mit Chromgelatine auf Objektträger aufgezogenen Paraffinschnitte wurden durch Bäder in Xylol und der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%) entparaffiniert und anschließend mit PBS-A gespült. Danach wurden sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte mit 3%igem H_2O_2 betropft und nach 5 Minuten Einwirkzeit erneut mit PBS-A gewaschen. Diese, wie auch alle folgenden Inkubationen, fand, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, in einer feuchten Kammer statt. Hierauf folgte eine Inkubation mit 10%igem Schweineserum (in PBS-A), das nach 20 Minuten durch Kippen der Objektträger zum größten Teil entfernt wurde. Die zu testenden Hybridomüberstände wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach durch Eintauchen der Schnitte in zimmerwarmes PBS-A wieder abgewaschen. Der zweite Antikörper, bestehend aus 8,9 ml PBS-A, 1 ml Schweineserum und 0,1 ml Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen), wirkte ebenfalls 60 Minuten ein. Ein weiterer PBS-A Spülgang folgte. Zur Sichtbarmachung der erfolg-

ten Reaktion wurde 10-15 Minuten mit AEC-Farblösung (20 mg 3-Amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma, München), gelöst in 12 ml Dimethylsulfoxid (Serva, Heidelberg), verdünnt mit 300 ml Barbitalpuffer pH 7,4-7,45 und 30 μ l H₂O₂ 30%) gefärbt und mit PBS-A gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Haemalaun. Nach dem Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit 40-50°C warmer Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt und nach dem Trocknen mit Zapon-Lack versiegelt.

Eine positive Reaktion war deutlich an der rot-bräunlichen Färbung der durch den Antikörper erkannten Zellen zu sehen.

1.10. Klonierung der Hybridome

Die durch verschiedene Testverfahren als Antikörper produzierend erkannten Hybridomzellgruppen wurden, um ein Überwuchern durch nicht Antikörper produzierende Hybridome zu verhindern, nach dem Verfahren der "limiting dilution" (LEFKOVITZ und WALDMANN, 1979) verdünnt. Dazu wurde der Zellinhalt einer "positiven Vertiefung" soweit verdünnt, daß in 1 μ l Medium im Durchschnitt höchstens 0,5-1 Hybridomzelle enthalten war. Nun wurden mittels einer Hamilton Pipette von jeder Linbro^R-Vertiefung eine Mikroplatte mit 96 Vertiefungen angelegt, wobei Mäuseperitonealmakrophagen als "feeder-layer" dienten.

Sobald die Hybridomzellen den Boden der Vertiefung zu über 80% bedeckten, wurde erneut getestet. Es folgten noch zwei weitere Klonierungen, und die Kolonien mit den besten Testergebnissen wurden in 50 ml NUNC^R Plastikflaschen vermehrt und konserviert. Alle 2-3 Monate wurden die Zellen einer Reklonierung unterworfen, um die nicht mehr IgG-produzierenden Hybridomzellen auszusortieren.

1.11. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen

Zur Gewinnung größerer Mengen Hybridomantikörper wurden stabile makrophagenfrei wachsende Hybridomzellen in die Peritonealhöhle von BALB/c Mäusen injiziert und die entstehende Bauchhöhlenflüssigkeit mit hohem Antikörpergehalt gewonnen (KATZ und BENACERAF, 1976). Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse mit 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Prestane^R, Ega-Chemie) intraperitoneal vorbehandelt (McKEARN, 1980). Nach einer Ruhezeit von mindestens drei Wochen wurden den Mäusen in Äthernarkose 10×10^6 Zellen intraperitoneal injiziert. Die Ausbildung des Ascites war nach 6-10 Tagen deutlich an der Umfangsvermehrung des Leibes zu erkennen. Mit einer weitlumigen Kanüle wurde die Bauchhöhle punktiert, die Ascitesflüssigkeit, meist 4-5 ml, gewonnen und für eine Stunde zur Fibringerinnung bei Raumtemperatur stehengelassen. Darauf schloß sich eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 2000 g an, um zellfreien Überstand zu gewinnen. Die Flüssigkeit verursachte auch noch in hohen Verdünnungen (1:5000) sehr ausgeprägte Anfärbungen an Targetzellen.

1.12. Absorptionen

Um die Spezifität der monoklonalen Antikörper quantitativ zu ermitteln, wurden Absorptionsversuche gemacht. 200 µl Proben des frischen oder mit Natriumazid konservierten Hybridomüberstandes wurden jeweils mit einer steigenden Zahl (10^3 , 5×10^3 , 5×10^4 , 10^5 , 2×10^5) von Zellen einer Gliomkultur eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (BECHTOL, 1980c). Während dieser Zeit erfolgte ein mehrfaches Suspensieren der Zellen im Medium. Nach weiteren 15 Stunden bei 4°C wurde die Inkubation mit einer 10minütigen Zentrifugation bei 2000 g abgeschlossen. Der Überstand wurde auf verbliebene Antikörper untersucht (mikro-ELISA). Als Kontrolle diente lyophilisiertes menschliches Gehirngewebe.

1.13. Gewinnung serumfreier Hybridomüberstände

Zur Gewinnung serumfreier Hybridomkulturüberstände wurden in Kulturflaschen semikonfluent gewachsene Hybridompopulationen in ihrem Medium aufgenommen und pellettiert. Der Pellet wurde in 30 ml Kulturmedium ohne FBS bzw. in serumfreiem Hybridomerhaltungsmedium (FEB, Seromed, Berlin) suspendiert und in eine 260 ml Falcon^R-Plastikflasche ausgesät. Nach dem Absterben der Zellen wurde der Überstand durch 10minütiges Zentrifugieren bei 400 g gewonnen und nach Zugabe von 0,02%-igem NaN_3 zur Konservierung bei 4°C gelagert oder bei -30°C eingefroren.

Bei der Benutzung von HC Medium (450 ml Dulbecco's Medium, 50 ml NCTC-135 (Flow Lab., Meckenheim), 5 ml Natrium-Pyruvat, 0,1 g Neomycin, 100 000 I.E. Penicillin) wurden nach 6 Tagen Membrandiskontinuitäten der Hybridomzellen sichtbar, die Zellen begannen abzusterben, nach 8 Tagen war keine mehr vital. Im Gegensatz dazu vermochte die Verwendung von serumfreiem FEB-Medium (Seromed, Berlin) das Eingehen der Zellen um 3 Tage hinauszuzögern.

Da eine längere Lebensdauer der Zellen im serumfreien Medium bei kontinuierlicher Abgabe von Immunglobulinen einen höheren Antikörpergehalt im Kulturüberstand verspricht, scheint die Anwendung dieses Spezialmediums als sinnvoll.

1.14. Immunglobulinanreicherung durch Präzipitation

Zur Konzentrierung der in Hybridomüberständen vorhandenen Immunglobuline wurden diese an Ammoniumsulfat präzipitiert.

Dazu wurde aus 1000 ml aqua dest. und 1000 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung hergestellt, diese 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht bei 4°C gelagert. Mit 30%iger NaOH wurde der pH auf 7,0 bis 7,1 eingestellt.

Der serumfreie Hybridomüberstand und die gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurden zu gleichen Teilen gemischt und für eine Stunde in ein Eisbad gestellt (FEY et al., 1976). Danach folgte eine 30minütige Ultrazentrifugation bei 48 000 g und 4°C. Das Zentrifugat wurde in wenigen ml einer 2 M Ammoniumsulfatlösung aufgenommen und erneut unter den oben angeführten Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment wurde in einer der gewünschten Einengung entsprechenden Menge aqua bidest. gelöst (JONAK, 1980).

Ein Dialyseschlauch wurde 10 Minuten in 2,5 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließend dreimal in kochendem aqua bidest. gewaschen, mit dem in aqua bidest. gelösten Präzipitat gefüllt und gegen 0,2 M Barbitalpuffer (pH 7,2-7,4) bzw. PBS-A (pH 7,2-7,3) dialysiert. Der Dialysevorgang war abgeschlossen, sobald im Außendialysat keine SO_4^{2-} Ionen mehr nachzuweisen waren. Dies konnte durch den BaCl_2 -Nachweis sichtbar gemacht werden. Dazu wurden 5 ml Außendialysat mit 2 N HCl angesäuert und anschließend mit drei Tropfen 10%iger BaCl_2 -Lösung versetzt. Das schwer lösliche BaSO_4 fiel als weißer Niederschlag aus.

1.15 Bestimmung der Immunglobulinklassen

Zur Bestimmung der Immunglobulinklassen der monoklonalen Antikörper wurde der Immundiffusionstest nach OUCHTERLONY (1962) durchgeführt.

In jedes zweite der sechs peripheren Löcher einer Immundiffusionsplatte ("Double diffusion discs", Miles Scientific, Bayer Diagnostik, München) wurden je 20 µl des durch die Ammoniumsulfatpräzipitation auf das 10- bzw. 20fache eingengten Hybridomüberstandes pipettiert, in die restlichen Löcher wurde PBS-A gefüllt. Das mittlere Loch erhielt als Füllung 20 µl eines "rabbit-anti-mouse" IgG, IgM, IgE bzw. verschiedener IgG-Subklassen. Die Löcher wurden, sofern der

Inhalt wegdiffundiert war, mehrmals, bis zu viermal, nachgefüllt. Nach 24-48 Stunden waren deutliche Präzipitationslinien sichtbar.

2. Ergebnisse

2.1. In vitro Kultivation humaner Hirntumoren

2.1.1. Wachstumsverhalten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primärkulturen wurden als Suspensions- und Explantationskulturen angelegt. Nach 3-4 Tagen waren Zellaussprossungen aus den Explantaten sichtbar; nach der gleichen Zeit waren auch erste Zellvermehrungen in den Suspensionskulturen zu beobachten.

Die in vitro-Lebensdauer der angelegten Zellkulturen lag zwischen 20 und 193 Tagen, daraus resultiert eine durchschnittliche Lebensdauer von 72,4 Tagen in Kultur.

Die Zeitspanne zwischen zwei 1:2 Teilungen einer Einzelkultur (Passagezeit) variierte von 1 bis zu 45 Tagen, wobei nach zunächst langsamerer Wachstumsquote die Passagezeiten immer kürzer wurden, um gegen Ende des Bestehens der Zelllinie wieder anzusteigen (Abb. 2).

2.1.2. Effekt an konditioniertem Medium

In Kultur wachsende Zellen entziehen dem sie umgebenden Medium Nährstoffe. Daneben nimmt man an, daß sich die Zellen durch die Abgabe von löslichen Faktoren in das Kulturmedium selbst günstigere Wachstumsbedingungen zu schaffen versuchen (HALLE, 1976).

Auf Grund dieser Erfahrungen wurde versucht, durch die Zugabe von 10% eines durch eine progressiv wachsende etablierte Zelllinie konditionierten zellfreien Mediums die Wachstumsrate der Tumorzellkulturen zu erhöhen. Wie aus Abb. 3 er-

Abb.2: Wachstumsverhalten von Zellkulturen am Beispiel eines Astrozytoms (N 22/85)

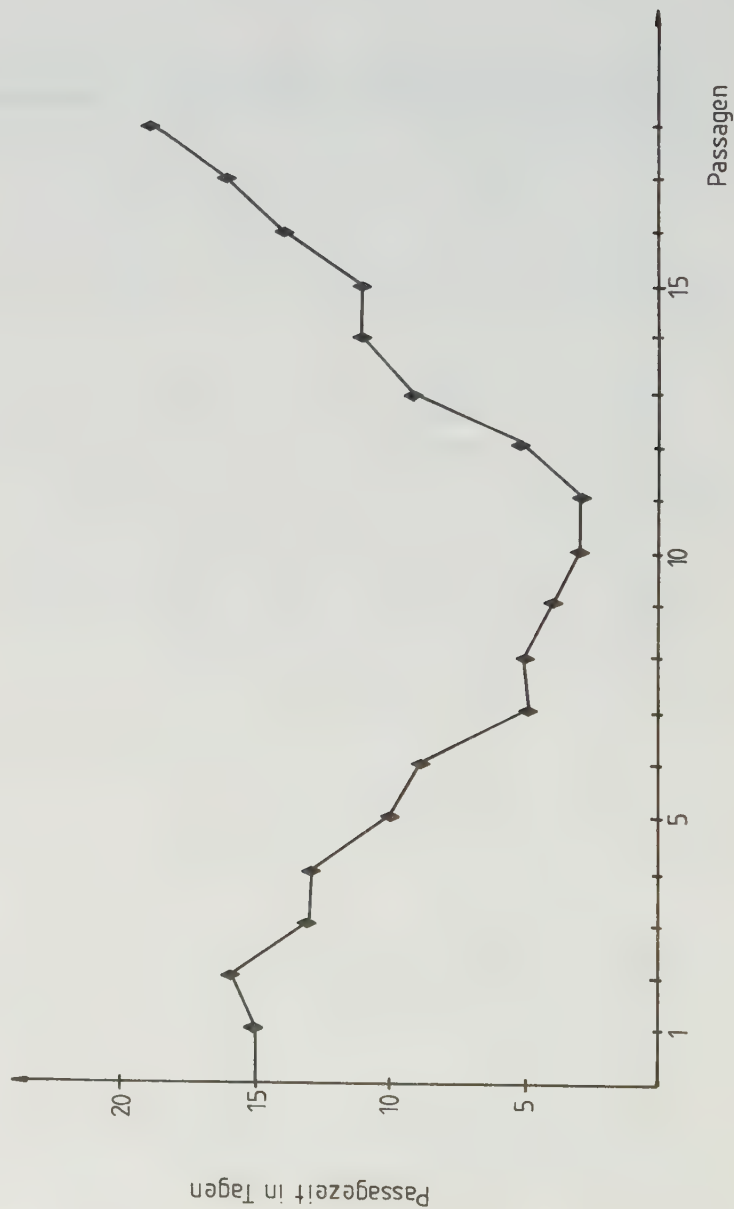
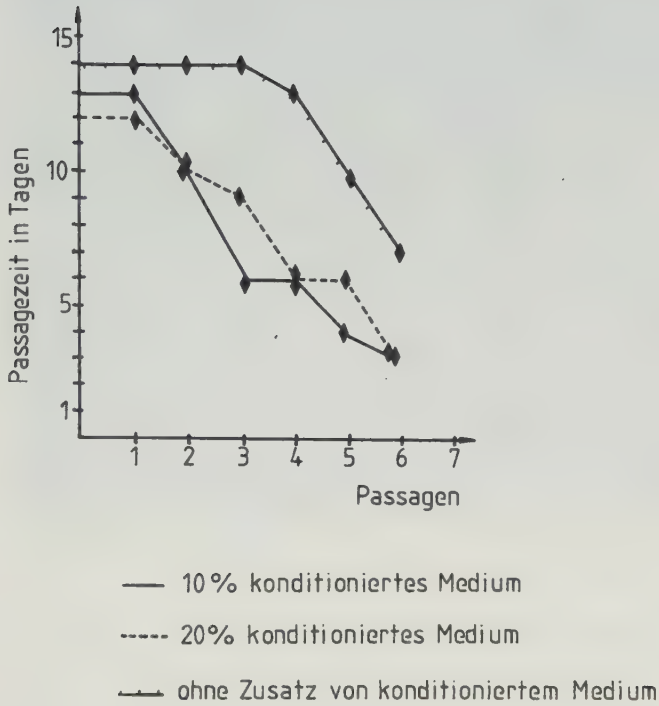


Abb.3: Einfluß von konditioniertem Medium auf das Wachstumsverhalten von Zellen am Beispiel eines Glioblastoms (N 73/85)



sichtlich, reduzierte sich die Passagezeit der Tumorzellen am Beispiel eines Glioblastoms (N 73/86) von 7 Tagen auf 3 Tage. Auch bei der Klonierung von Hybridomen schien die Zugabe von konditioniertem Medium positive Auswirkungen auf das Hybridomwachstum zu haben (PICKERING und GELDER, 1982). Ein Erhöhen des Zusatzes von konditioniertem Medium auf 20%, bezogen zur Gesamtmenge des Mediums, hatte keine zusätzliche Verkürzung der Passagezeit zur Folge.

2.1.3. Lichtmikroskopische Befunde

Die Zellen der als Kulturen wachsenden Gliome stellten sich lichtmikroskopisch sowohl untereinander als auch innerhalb einer einzelnen Kultur als sehr heterogene Population dar. Neben vielfältigen Übergangsformen dominierten zwei Typen. Zum einen prominierte ein länglicher schlanker Zelltyp, meist mit zwei polar gelegenen, oft auch mit drei Fortsätzen. Der längliche bis ovale Kern lag häufig exzentrisch und war chromatinreich. Mit zunehmendem Alter der Kulturen überwog, neben anderen, ein zweiter Zelltyp. Die Zellen wurden plumper, zytoplasmareicher, die Fortsätze verschwanden bis auf kurze Reste fast vollständig. Diese Erscheinungen gingen stets mit einer Wachstumsverlangsamung der Gesamtkultur einher. Dieses Verhalten war repräsentativ für nahezu alle als Zellkultur wachsenden Gliome.

2.1.4. db-cAMP Differenzierung von Gliomzellen

Nach der Behandlung mit $N^6O^{2'}$ -Dibutyryl-Adenosin 3'5'-Monophosphat-Natriumsalz (db-cAMP) konnten mehrere Veränderungen des Wachstumsverhaltens der Hirntumorzellen in Kultur beobachtet werden (Abb. 4).

- a) Verlängerung und Verbreiterung der vorhandenen und Ausbildung zahlreicher zusätzlicher Zellfortsätze
- b) Wachstumsdepression der Zellkultur

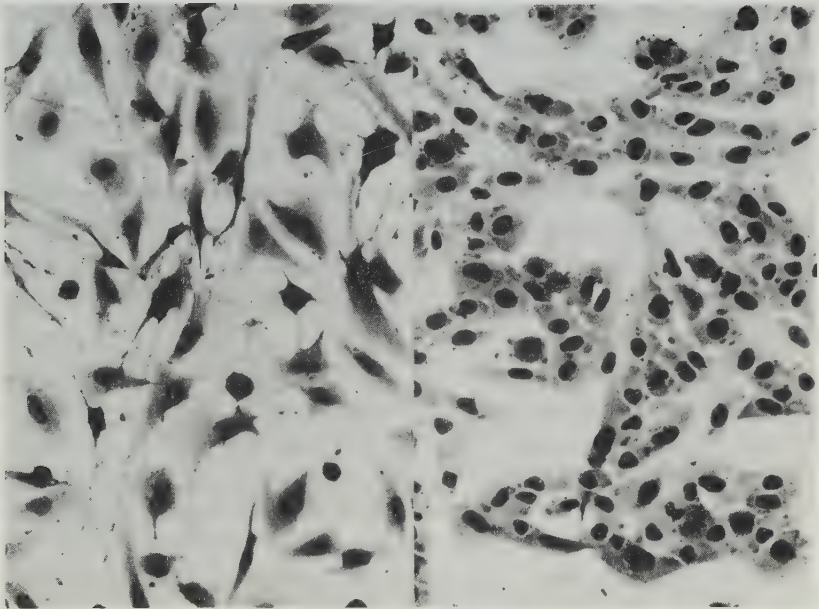


Abb. 4: Zellkultur eines Glioblastoms (N 63/85)
10 Stunden nach Behandlung mit db-cAMP (a).
Zum Vergleich die unbehandelte Kultur (b).
Deutlich erkennbare Wachstumsdepression der
behandelten Kultur mit Ausbildung zusätz-
licher feiner Fortsätze.

Erste lichtmikroskopisch sichtbare Unterschiede zwischen der behandelten und der Kontrollkultur wurden 10 Stunden nach Behandlungsbeginn erkennbar; eine Ausdehnung des Versuchs über 24 Stunden hinaus verdeutlichte das Ergebnis nicht wesentlich. Eine höhere Effektivität der db-cAMP-Behandlung konnte durch die alle 4-6 Stunden erfolgende Erneuerung des db-cAMP-haltigen Mediums erreicht werden.

2.1.5. Darstellung von GFA- und S 100-Protein

Der Nachweis des sauren Gliafaserproteins (GFAP) wurde anhand der PAP-Reaktion bei allen im Rahmen des "screening" untersuchten Tumoren (Tab. 1) vorgenommen. Dabei zeigte sich in den untersuchten Schnitten eine ausgeprägte Heterogenität in der Zellanfärbung.

So erschienen Astrozyten in fibrillären Astrozytomen deutlich positiv; sie zeigten faserförmige rot-bräunliche Strukturen. Die GFAP-Kennzeichnung in protoplasmatischen Astrozyten fand sich hingegen zirkulär um den Zellkern. Riesenzellen wurden nur etwa zur Hälfte angefärbt und in den undifferenzierten bzw. anaplastischen Tumorarealen fanden sich nur einige positive Tumorzellen. In den Randbezirken der Tumoren zeigten sich reaktive Astrozyten sehr deutlich positiv.

Die im Tumorgewebe vorhandenen Gefäße stellten sich deutlich rot-bräunlich dar, verursacht durch das Umgreifen der Astrozytenfortsätze. Die in Glioblastomen jedoch auftretenden neugebildeten Gefäßknäuel enthielten meist kein nachweisbares GFAP.

Die nach der PAP-Methode auf GFAP-Darstellung untersuchten Zellkulturen zeigten im allgemeinen eine größere Anzahl angefärbter Zellen als im korrespondierenden Paraffinschnitt.

Unter Zugrundelegung dieser Befunde lassen sich drei Gruppen unterscheiden: Zellkulturen, deren Zellen sich zu über 80% anfärben ließen, Kulturen, deren Zellen nur ganz vereinzelt eine rot-bräunliche Tönung aufwiesen und andere, bei denen in nahezu jeder Zelle ein Saum von GFAP um den Zellkern herum nachzuweisen war.

Membrangebundenes und gelöstes S 100 wurde in allen geprüften Paraffinschnitten angefärbt. Die Anfärbung der Zellen war ungenau, die Zellgestalt nicht exakt ansprechbar, so daß einzelne Zelltypen nicht mit Sicherheit zu benennen waren.

Das rot-braune Reaktionsprodukt fand sich diffus in Arealen, zum Teil unspezifisch in geschwollenen Kapillärwänden und in Zellen membrangebunden.

Auch in Zellkultur überwiegte eine diffuse undeutliche Anfärbung, ein höheres Maß an unspezifischer, nicht zellgebundener Färbung erschwerte die Beurteilung. Auch hier deutliche Heterogenität der Zellen, eine Korrelation der Anzahl der erkannten Zellen in Schnitt und Kultur war nicht zu erkennen.

2.2. Tumorigenität humaner Gliomzellen in Nacktmäusen

Die durchgeführten subcutanen Transplantationen von Einzelsuspensionen oder Tumorgewebsstückchen in thymusaplastische BALB/c-nu/nu Nacktmäuse führte innerhalb einer Wartezeit von jeweils 3 Monaten nur in einem Fall zum Wachstum eines Tumors. Auch die in den Fällen N 43/85 und N 49/85 durchgeführte zusätzliche Immunsuppression durch die mehrmalige subcutane Injektion von 0,1 ml Dexamethason und 0,3 ml Cyclosporin hatte nicht den gewünschten Erfolg (Tab. 4).

Tabelle 4: Tumortransplantation in Nacktmäuse

Tumor Nr.	Diagnose des transplantierten Tumors	Menge	Transplantationsstelle	Tiere	Immunsuppressive Behandlung	Ergebnis
1. N 42/85	Astrozytom II	5 x 10 ⁶ Zellen	subcutan, interscapulär	3 BALB/c-nu/nu Mäuse	-	Ø
2. N 43/85	Glioblastoma multiforme	1 x 1 x 1 mm Stücke Frischmaterial	subcutan, interscapulär	2 BALB/c-nu/nu Mäuse	Immunsuppression mit 0,1 ml Dexamethason, 0,3 ml Cyclosporin s.c. (3 x) 1., 3. (Tag der Transplantation), 5. Tag	Ø
3. N 48/85	Astrozytom III Rezidiv	1 x 1 x 1 mm Stücke Frischmaterial	subcutan, seitlicher Thorax	1 BALB/c-nu/nu Maus	-	Ø
4. N 49/85	Astrozytom III	1 x 1 x 1 mm Stücke Frischmaterial	subcutan, seitlicher Thorax	2 BALB/c-nu/nu Mäuse	Immunsuppression mit 0,1 ml Dexamethason, 0,3 ml Cyclosporin s.c. 1., 2. (Tag der Transplantation), 3. Tag	Ø
5. N 58/85	Astrozytom III	1 x 1 x 1 mm Stücke Frischmaterial	subcutan, seitlicher Thorax	1 BALB/c-nu/nu Maus	-	Tumorstadium 16 Tage posttransplantationem
6. N 8/86	Astrozytom III	4-6 0,5 mm Ø Stücke bzw. Zellsuspension 1 x 10 ⁶ Zellen	subcutan, seitlicher Thorax	2 BALB/c-nu/nu Mäuse	-	Ø

2.3. Zellfusion und Selektion von Hybridomklonen

Nach erfolgter Fusion und Stabilisierungsphase wurden die Zellen gleichmäßig auf drei Mikroplatten mit je 96 Vertiefungen ausgesät. Als "feeder-layer" dienten Mäuseperitonealmakrophagen. Zwei Reihen mit je 12 Vertiefungen wurden ausschließlich mit Myelomzellen (X63-Ag8.653) besetzt, um die Auswirkungen des HAT-(Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) Mediums verfolgen zu können. Das Selektionsmedium bestand aus DMEM (Flow Lab., Meckenheim), dem pro Liter 10 ml einer 0,04 mM Aminopterinorratslösung (Sigma), 10 ml einer 10 mM Hypoxanthin-1/6 mM Thymidinorratslösung (Sigma), 100 000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 20% FBS zugesetzt wurde.

Bereits nach drei Tagen waren die ersten Hybridomzellen zu erkennen. Sie waren von Makrophagen und Myelomzellen morphologisch unterscheidbar, da sie, rund oder oval, gelegentlich birnenförmig mit zweischichtig scheinender Zellmembran immer zu mehreren zusammenlagen. Dies ließ darauf schließen, daß eine Zellfusion stattgefunden hatte, und die entstandenen Hybridzellen sich bereits zu teilen begannen. Nach 13 Tagen waren die als Kontrollen dienenden Myelomzellen abgestorben, und das HAT-Medium wurde durch das endgültige, HCM, bestehend aus 900 ml DMEM (Flow Lab., Meckenheim), 100 ml NCTC-135-Medium (Gibco), 200 ml FBS, 10 ml Natrium Pyruvat, 100 000 I.E. Penicillin und 0,1 g Streptomycin ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich in 151 von 264 Vertiefungen Hybridomzellen. Das entspricht einem Prozentsatz von 57,2%. Bei einer Zellzahl von $1,2 \times 10^7$ Milz- und 3×10^7 Myelomzellen hatte die Fusionsrate also mindestens 5×10^{-6} betragen, vorausgesetzt, daß pro hybridomhaltiger Vertiefung eine Milzzell-/Myelomzellfusion stattgefunden hatte. Tatsächlich waren es wahrscheinlich mehr, da an verschiedenen Stellen einer Vertiefung Hybridomzellgruppen sichtbar waren. Da jedoch nicht zu ermitteln war, ob es sich dabei eventuell um Hybridom-

zellen der gleichen Elternzellen handelte, wurde davon ausgegangen, daß pro Vertiefung nur eine Zellfusion erfolgt war.

In den folgenden Tagen wurden die Überstände der Vertiefungen mit Hybridomwachstum mit dem Indirekten Immunperoxidasetest auf Tumorzellmonolayern in Terasaki-Mikroplatten getestet. Von den 151 hybridomhaltigen Vertiefungen reagierten 24 mit einer durch AEC-Farblösung sichtbar gemachten Anlagerung von Antikörpern an die Oberflächenantigene der Targetzellen. Das entspricht 15,9%. Die Hybridome der im Indirekten Immunperoxidasetest positiv reagierenden Vertiefungen wurden weitergezogen. Zur Spezifitätstestung der abgegebenen Antikörper erfolgte daraufhin eine Indirekte Immunperoxidase-Färbung auf Hirntumormaterial, das mit Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet worden war. Dieser Test ermittelte, daß 4 Überstände der verbliebenen 24 Hybridomvertiefungen eine Reaktion auf Tumorschnitten zeigten. Daraufhin wurden drei weitere Klonierungen durchgeführt, und dadurch 6 Mäusehybridomklone ("murine clone" MUC 7-22, MUC 8-22, MUC 10-22, MUC 11-22, MUC 14-22, MUC 15-22) selektiert. Diese Klone produzierten Antikörper, die sich in allen geprüften Fällen an Zellen glialer Tumoren zu binden vermochten. Die Untersuchung der Affinität der monoklonalen Antikörper an Zellen nicht neurogener Tumoren (Plattenepithelkarzinom, Nierenkarzinom, Mammakarzinom, Rhabdomyosarkom) ergab in keinem Fall eine positive Reaktion.

2.4. Charakterisierung der sezernierten Immunglobuline

2.4.1. Immunodiffusion

Die 10:1 bzw. 20:1 eingengten serumfreien Kulturüberstände der sechs Klone MUC 7-22, MUC 8-22, MUC 10-22, MUC 11-22, MUC 14-22 und MUC 15-22 wurden auf Ouchterlony-Platten gegen

IgG, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgM getestet. Zwischen den mit rabbit-anti-mouse IgG und den mit rabbit-anti-mouse IgG_{2a} gefüllten Löchern und den getesteten Hybridomüberständen bildeten sich Präzipitationslinien aus. Daraus konnte auf die Anwesenheit von IgG_{2a} im Kulturüberstand geschlossen werden.

2.4.2. Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in serumfreien präzipitierten Hybridomkulturüberständen (FEB Medium) erfolgte, nachdem von mehreren aufeinanderfolgenden Passagen der Hybridome Überstände gesammelt worden waren. Mithin ergaben sich folgende Durchschnittswerte (Tab. 5).

Tabelle 5: Gesamtproteinmenge in serumfreien Hybridomkulturüberständen

Hybridom-Subklone	Proteinmenge in 20:1 konzentriertem Überstand (mg/ml)	entspricht in nativem Überstand (µg/ml)
MUC 7-22	1,17	58,5
MUC 8-22	0,85	47,5
MUC 10-22	0,91	45,5
MUC 11-22	1,04	50,02
MUC 14-22	1.14	57,0
MUC 15-22	0,89	44,5

2.5. Reaktivität der erhaltenen monoklonalen Antikörper

2.5.1. Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an primäre Hirntumoren

2.5.1.1. Gefrierschnitte

Die zur Testung des Bindungsverhaltens von MUC 7-22 bis MUC 15-22 herangezogenen Gefrierschnittpräparate waren nativ und Aceton-fixiert verwendet worden. Die Anfärbung der Zellen erschien meist deutlich bräunlich-rot. Wie bei den Paraffinschnittfärbungen beobachtet, zeigte sich auch hier eine deutliche Zellheterogenität, dokumentiert in unterschiedlicher Anfärbbarkeit der Zellen. Besonders deutlich war das Fehlen der Antikörperbindung an Zellen bzw. Zelltrümmern in Nekroseherden und an Gefäßendothelzellen. Der Vergleich zwischen nativ luftgetrocknet verwendeten und mit kaltem Aceton fixierten Gefrierschnitten zeigt in bezug auf Anzahl der erkannten Zellen keine nennenswerten Unterschiede (Tab. 6, 7). Die Auswertung wurde anhand der Anzahl der angefärbten Zellen vorgenommen:

- : keine Zellen angefärbt
- +: einzelne Zellen angefärbt
- ++: < 50% der Zellen angefärbt
- +++: > 50% der Zellen angefärbt

2.5.1.2. Paraffinschnitte

Da bei der Entwicklung monoklonaler Antikörper hauptsächlich daran gedacht wurde, sie diagnostisch im Rahmen der Immunhistochemie anwenden zu können, sollte anhand Indirekter Immunperoxidasetests ermittelt werden, ob die selektierten Antikörper (MUC 7-22 bis MUC 15-22) Zellen in paraffin-eingebettetem Material erkennen.

Tabelle 6: Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Hirntumorzellen in Acetonfixierten Gefrierschnitten

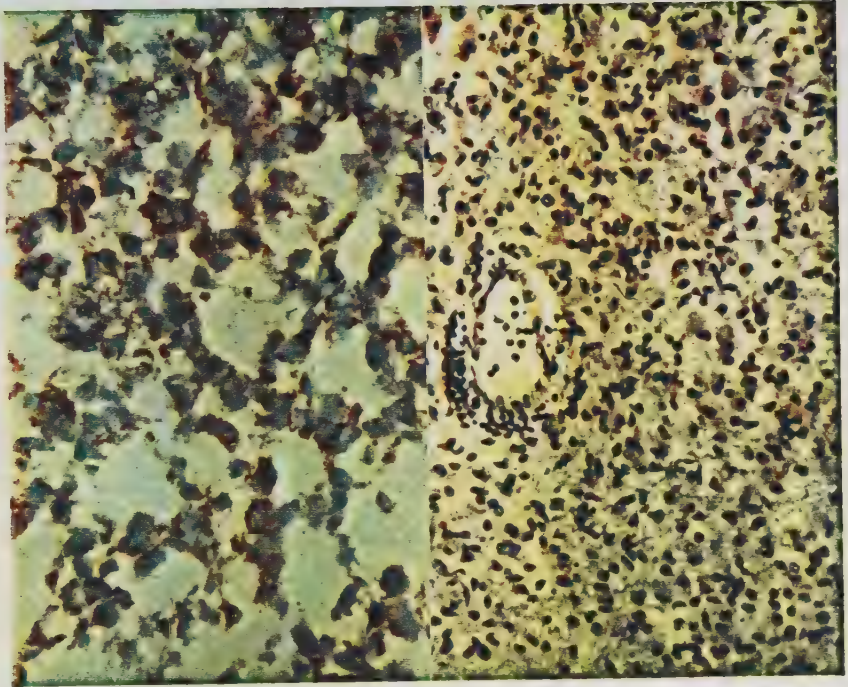
Tumor	Monoklonale Antikörper									
	MUC 7-22	MUC 8-22	MUC 10-22	MUC 11-22	MUC 14-22	MUC 15-22				
1. N 44/85	++	+++	+++	+++	+++	+++				
2. N 47/85	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
3. N 48/85	+	+++	+++	+++	+++	+++				
4. N 49/85	+++	+++	+++	+++	++	+++				
5. N 53/85	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
6. N 55/85	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
7. N 61/85	+++	+++	++	+++	+++	+++				
8. N 62/85	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
9. N 3/86	+++	+++	+++	+++	+++	++				
10. N 16/86	+++	+++	++	+++	+++	+++				
11. N 18/86	+++	++	+	+++	+	+++				

- : keine Zellen angefärbt ++ : < 50% der Zellen angefärbt
 + : einzelne Zellen angefärbt +++ : > 50% der Zellen angefärbt

Tabelle 7: Vergleich des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Tumorzellen in nativen und Aceton-fixierten Gefrierschnitten

	nativ						Aceton-fixiert					
	7-22	8-22	10-22	11-22	14-22	15-22	7-22	8-22	10-22	11-22	14-22	15-22
1. N 17/86	++	+++	++	+	+++	++	++	+	++	+++	+	+++
2. N 20/86	+	++	+	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+	+++
3. N 21/86	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++
4. N 23/86	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+	+
5. N 24/86	+	++	++	+	++	++	+	++	++	+	++	++
6. N 29/86	++	+++	++	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
7. N 30/86	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
8. N 31/86	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
9. N 32/86	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10. N 33/86	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : keine Zellen angefärbt ++ : < 50% der Zellen angefärbt
+ : einzelne Zellen angefärbt +++ : > 50% der Zellen angefärbt



a)

b)

Abb. 5: Deutlich höhere Anzahl von MUC 8-22 erkannten Zellen im Gefrierschnitt (a) (rot-bräunliche Farbstoffanlagerung) im Vergleich zum Paraffinschnitt (b) (Glioblastom N 31/86)

Tabelle 8: Nachweis tumorassoziiierter Antigene an Gliomgewebe mittels monoklonaler Antikörper unter verschiedenen Fixationsbedingungen und anschließender Paraffin-einbettung

Antikörper	Tumor	Fixierung		
		Bouin	Methanol/Aceton	Karnovsky
MUC 7-22	N 23/86	++	++	++
	N 24/86	+++	+++	+
	N 28/86	+++	+++	+++
	N 29/86	+++	+++	++
	N 30/86	++	+	+
	N 31/86	++	++	++
	N 32/86	+++	+++	++
	N 33/86	+++	+++	+
MUC 8-22	N 23/86	++	++	+
	N 28/86	++	+	++
	N 29/86	+++	+++	++
	N 30/86	+++	++	+++
	N 31/86	+++	++	+++
	N 32/86	+	+++	+
	N 33/86	+	+++	+
MUC 10-22	N 23/86	+++	+++	++
	N 24/86	++	++	+
	N 28/86	+++	+++	++
	N 29/86	+++	+++	++
	N 30/86	+	++	+
	N 31/86	+++	+++	++
	N 32/86	++	+++	++
	N 33/86	++	+++	+
MUC 11-22	N 23/86	+++	+++	++
	N 24/86	++	++	+
	N 28/86	+++	+++	++
	N 29/86	+++	+++	++

Tabelle 8: Nachweis tumorassoziierter Antigene an Gliomgewebe mittels monoklonaler Antikörper unter verschiedenen Fixationsbedingungen und anschließender Paraffineinbettung (Fortsetzung)

Antikörper	Tumor	Fixierung		
		Bouin	Methanol/Aceton	Karnovsky
MUC 11-22	N 30/86	+	++	+
	N 31/86	+++	+++	++
	N 32/86	++	+++	+++
	N 33/86	++	+++	+
MUC 14-22	N 23/86	+	++	+
	N 24/86	++	++	+++
	N 28/86	+	+++	++
	N 29/86	+	+	+
	N 30/86	+	+	+
	N 31/86	+++	+++	+++
	N 32/86	++	+++	+
	N 33/86	++	++	+
MUC 15-22	N 23/86	+	+++	++
	N 24/86	++	+	++
	N 28/86	+++	+++	+++
	N 29/86	++	+++	++
	N 30/86	++	+++	++
	N 31/86	+++	+++	+++
	N 32/86	+++	+++	++
	N 33/86	+++	+++	+

- : keine Zellen angefärbt ++ : < 50% der Zellen angefärbt

+ : einzelne Zellen angefärbt +++ : > 50% der Zellen angefärbt

Des weiteren sollte durch die Anwendung verschiedener Fixierungsmethoden die Stabilität der tumorassozierten Antigene geprüft werden. Wie in Tabelle 8 an einigen Beispielen dargelegt, ist keine definitive Aussage über den Einfluß der Fixierung möglich, da die Anzahl der angefärbten Zellen wenig variierte. Das Anfärbungsergebnis scheint außerdem sehr stark von der technischen Aufbereitung des Materials abhängig zu sein.

2.5.2. Vergleich des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Tumorzellen in Gefrier- und Paraffinschnitten

Im Rahmen eines Parallelversuchs wurde die Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper an Zellen in Gefrierschnitten und Paraffinschnitten verglichen. Die Gefrierschnitte wurden in nativem oder Aceton-fixierten Zustand verwendet. Die Paraffinschnitte stammten aus Bouin-fixiertem Material.

Während des Färbevorganges erwiesen sich die mit Aceton fixierten Gefrierschnitte als wesentlich widerstandsfähiger gegenüber mechanischen Belastungen wie Spülen und Abtupfen als die unfixierten Gefrierschnitte.

Im Durchschnitt jedoch zeigte sich, daß die Anfärbung der Gliomzellen in den Gefrierschnitten im Vergleich mit den Schnitten aus Paraffin-eingebettetem Tumormaterial am deutlichsten war (Tab. 9, 10, Abb. 5). Selbst in Fällen, in denen im Paraffinschnitt nur einzelne Zellen erkannt wurden (N 48/86), führte die Vielzahl der angefärbten Zellen im Gefrierschnitt zu Werten bis "+++". Die Diskrepanz der Ergebnisse war zwischen Formalin-fixiertem Gewebe und Gefrierschnitten am größten. Die Unterschiede betrugen bis zu 4 Gradstufen ("- und +++"). Im Vergleich dazu waren die Unterschiede zwischen Bouin-fixiertem Gewebe und Gefrierschnitten geringer (zwei Gradstufen: "+" und +++).

Tabelle 9: Vergleich des Bindungsverhaltens von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Paraffin- (PS, Bouinfixiert) und nativen Gefrierschnitten (GS) von Astrozytomen und Oligodendroglomen

Tumortyp	Monoklonale Antikörper											
	MUC 7-22			MUC 8-22			MUC 10-22			MUC 11-22		
	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS
1. N 44/85 Mischgliom III	+	++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
2. N 48/85 Astrozytom III	+	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	++	+++
3. N 49/85 Astrozytom III	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
4. N 55/85 Astrozytom II-III	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+	+++	+	+++
5. N 13/86 Astrozytom III	+	o	+	o	++	o	++	o	+	o	+++	o
6. N 17/86 Astrozytom II	+	++	+	+	+	++	+	+++	+	+	+	+++
7. N 20/86 Oligodendrogliom III	+	++	++	++	++	+++	++	+	+	+	+++	+++
8. N 21/86 Astrozytom III-IV	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++
9. N 24/86 Oligodendrogliom III	+++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++
10. N 28/86 Astrozytom III	+++	o	+++	o	+++	o	+++	o	+++	o	+++	o
11. N 30/86 Astrozytom III	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++
12. N 32/86 Astrozytom II	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : keine Zellen angefärbt

+ : einzelne Zellen angefärbt

++ : < 50% der Zellen angefärbt

+++ : > 50% der Zellen angefärbt

o : nicht untersucht

Tabelle 10: Vergleich des Bindungsverhaltens von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Paraffin- (PS, Bouin-fixiert) und Gefrierschnitten (GS) von Glioblastomen

Tumortyp	Monoklonale Antikörper													
	MUC 7-22		MUC 8-22		MUC 10-22		MUC 11-22		MUC 14-22		MUC 15-22			
	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS
1. N 47/85 Glioblastom	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
2. N 53/85 Glioblastom	++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
3. N 56/85 Glioblastom	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
4. N 3/86 Glioblastom	+++	+++	++	+++	+	+++	++	+++	+	+++	++	+++	++	+++
5. N 6/86 Glioblastom	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
6. N 18/86 Glioblastom	+	+++	+	++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+++
7. N 23/86 Glioblastom	++	+	++	++	+++	+	++	+++	++	+	+++	+	+++	+
8. N 29/86 Glioblastom	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
9. N 31/86 Glioblastom	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10. N 33/86 Glioblastom	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++

- : keine Zellen angefärbt

+ : einzelne Zellen angefärbt

++ : < 50% der Zellen angefärbt

+++ : > 50% der Zellen angefärbt

2.5.3. Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Gliomzellkulturen

Um die Bindungsaffinität der monoklonalen Antikörper der Hybridomüberstände an Tumorzellen zu testen, wurden Indirekte Immunperoxidasetests auf Monolayern von Gliomzellkulturen durchgeführt.

Das Reaktionsprodukt an den erkannten Zellen stellte sich als eine deutliche rot-braune Färbung dar. In den geprüften Fällen zeigten sich Unterschiede in der Anzahl der erkannten Zellen. Auch die Indirekte Immunperoxidase an Zellkulturen zeigte eine Heterogenität der Zellpopulation, dokumentiert in einer farblichen Kennzeichnung, die selten alle Kulturzellen betraf. Im Durchschnitt jedoch wurden im Vergleich mit den korrespondierenden Paraffinschnitten wesentlich höhere Werte erreicht (Tab. 11).

2.5.4. Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an embryonale Zellen

Zur Erkennung des Bindungsspektrums der monoklonalen Antikörper wurden Zellen von zwei Embryonen (9. Schwangerschaftswoche) herangezogen. Für die in vitro Etablierung embryonaler Zellen wurden Gewebeproben sowohl aus der Hirnanlage als auch aus dem Restgewebe gewonnen und in verschiedenen Kulturgefäßen explantiert.

Die aus den verschiedenen Segmenten der Embryonen entstandenen Zellkulturen wiesen eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit auf, die es nötig machte, die Kulturen jeweils nach 2-3 Tagen zu teilen.

Die Überstände der sechs selektierten Hybridom-Klone wurden auf diesen Zellkulturen getestet, sobald sie die erste Passage überschritten hatten (Tab. 12).

Tabelle 11: Bindungsverhalten von MUC 7-22 bis MUC 15-22 an in vitro kultivierte Gliomzellen

Zellkultur	Monoklonale Antikörper									
	MUC 7-22	MUC 8-22	MUC 10-22	MUC 11-22	MUC 14-22	MUC 15-22				
1. 85HG-59	++	+++	++	++	+	+++				
2. 85HG-63	+++	++	++	+++	+	++				
3. 85HG-64	+++	+++	+++	+++	+	++				
4. 85HG-65	+++	++	+++	++	++	+++				
5. 86HG- 8	++	+	+	+	+	+				
6. 86HG-13	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
7. 86HG-16	+	+	+	+	++	+				
8. 86HG-18	++	+	+	+	++	++				
9. 86HG-20	+++	+++	+	++	++	++				
10. 86HG-24	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
11. 86HG-29	+++	+++	+++	+++	+++	+++				

- : keine Zellen angefärbt ++ : $\approx$ 50% der Zellen angefärbt
+ : einzelne Zellen angefärbt +++ : $>$ 50% der Zellen angefärbt

Tabelle 12: Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper
MUC 7-22 bis MUC 15-22 an embryonalen Hirnzellen
sowie an Zellen des übrigen Körpers

Antikörper	Hirnzellen	Nicht-Hirnzellen
MUC 7-22	+++	+
MUC 8-22	+++	++
MUC 10-22	+++	+++
MUC 11-22	+++	++
MUC 14-22	+++	++
MUC 15-22	+++	+++

Aus der zusammenfassenden Darstellung der Ergebnisse dieser Testreihe (Tab. 12) geht hervor, daß offensichtlich alle untersuchten Überstände sich an kultivierte Zellen eines Embryos (9. Schwangerschaftswoche) binden konnten.

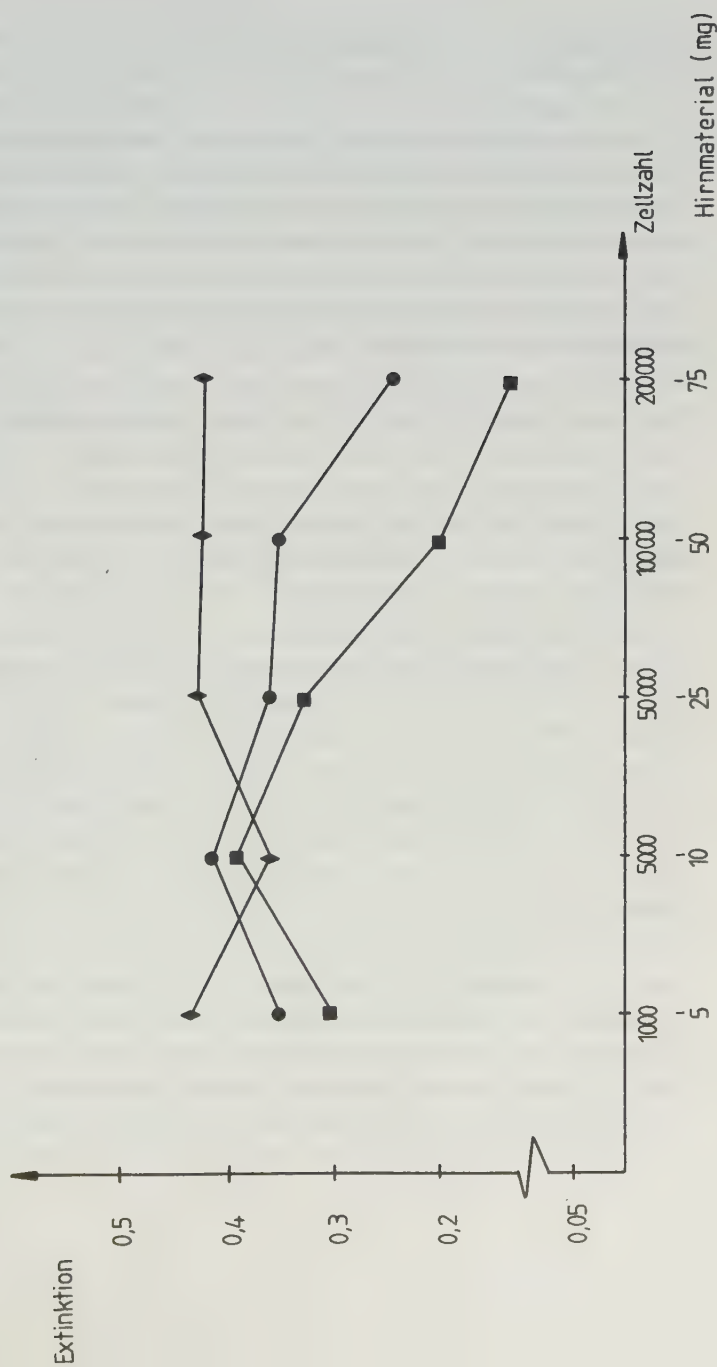
2.6. Quantitative Absorption

Für die Absorptionsversuche wurden zwei Gliomzelllinien N 63/85 und N 3/86 verwendet. N 63/85 ist eine etablierte Glioblastom-Zelllinie, die mehrfach als Targetzelle verwendet wurde. Bei N 3/86 handelt es sich um kultivierte Zellen aus einem Rezidivtumor desjenigen Patienten, aus dessen Primärtumor Material zur Immunisierung der Maus verwendet worden war, deren Milzzellen als Fusionspartner für X63-Ag8.653 Verwendung fanden. Als Kontrollwerte dienten vergleichbare Mengen lyophilisierten Normalhirngewebes.

Nach Ende der Absorptionszeit wurde zur Bestimmung der nichtgebundenen Antikörper in den zentrifugierten zellfreien Überständen diese in einem mikro-ELISA gegen N 59/85 als Targetzellen getestet. Hierbei zeigte sich, daß eine direkte Korrelation zwischen der verwendeten Zellzahl und der im Überstand verbliebenen Antikörper bestand.

Die spezifische Bindung der monoklonalen Antikörper an N 3/86 Tumorzellen (Rezidivtumor des als Antigen verwendeten Hirntumors) unterschied sich von der an N 63/85 durch wesentlich stärkere Absorptionen im Bereich hoher zur Adsorption verwendeter Zellzahlen (Abb. 6). Der hohe Antikörpergehalt im Überstand des lyophilisierten Hirnmaterials (Negativkontrolle) zeigt die fehlende Bindung der Antikörper an Normalhirngewebe.

Abb. 6: Absorption von Antikörpern aus Hybridomkulturüberständen am Beispiel MUC 8-22 an Zellen der Linien N 3/86 (■) und N 63/86 (●) sowie an lyophilisiertem Hirnmaterial (◆)



E Diskussion

Aus der Fusion zwischen Milzzellen immunisierter Mäuse und der Maus-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 gingen sechs Hybridsubklone hervor, die Antikörper gegen Hirntumorzellen sezernierten. Bei den anderen vorselektierten Subklonen war die Antikörperproduktion in unterschiedlichen Abständen zur Fusion unter die mit den angewendeten Verfahren mögliche Nachweisgrenze gesunken.

Als Ursache kamen vor allem Chromosomenverluste in Betracht, die, wenn auch häufiger bei Interspezieshybridomen phylogenetisch entfernter Fusionspartner (KÖHLER et al., 1978) auch bei Intraspezieshybridomen gelegentlich auftreten. Da die Einstellung der Antikörperproduktion irreversibel ist (KÖHLER, 1980), wurden die "non-producer" aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die Immunisierungen der Mäuse waren mit Einzelzellsuspensionen aus Tumorgewebe vorgenommen worden. Ein Großteil der bisher erfolgten Immunisierungen (HELLSTRÖM, 1980; STAVROU et al., 1983) wurde mit Tumorzellen aus in Zellkultur gezogenen Zelllinien durchgeführt. Der Umstand, daß sich in solchen Zellsuspensionen ausschließlich die gewünschten Gliomzellen befinden und Zellbeimengungen wie Erythrozyten, Lymphozyten, Gefäßendothelzellen usw. fehlten, hatte zu dieser Methode geführt.

Die Immunisierung mit Zellen aus Tumormaterial hat mehrere Vorteile. Zunächst ist das Gewebe im Gegensatz zu Zellen aus Zellkulturen jederzeit, entweder frisch oder tiefgefroren, verfügbar. Da sich nicht aus allen Hirntumoren Zellkulturen über mehrere Passagen erhalten lassen, wären nur mit einem geringen Teil der Tumoren Immunisierungen überhaupt möglich.

Die Vielfältigkeit des Antigenangebotes an die B-Lymphozyten der Maus ist bei einer Sensibilisierung mit Zellen aus Hirntumormaterial sicherlich größer. Aus diesem Umstand ergeben sich mehrere Aspekte. Einerseits ist die Population der sich auf den Antigenreiz hin vermehrenden Blastzellen sehr viel größer, was später ein intensives "screening" notwendig macht. Zellen in Zellkultur können jedoch schon allein durch die veränderten Proliferationsbedingungen, den Wegfall des Gewebeverbandes und andere Faktoren so stark verändert und selektiert sein (MANUELIDIS, 1969), daß die von den Hybridomen sezernierten Antikörper zwar eine Bindungsfähigkeit an Hirntumorzellen in Kulturen haben, jedoch nicht an die in Gewebeschnitten.

Nach einer längeren Ruhezeit wurde intrasplenal geboostert. Diese Methode hat nach GEARING et al. (1984) und SPITZ et al. (1984) mehrere entscheidende Vorteile. Bei intraperitonealen und ganz besonders bei intravenösen Injektionen kann das Antigen durch eventuell zirkulierende Antikörper neutralisiert werden und somit seinen Stimulierungseffekt auf die "memory"-B-Zellen in der Milz verlieren. Da die Tumorzellen bei einer intrasplenalen Deponierung praktisch direkt mit den Zielzellen in Berührung kommen, wird die Gefahr der Neutralisierung weitmöglichst umgangen. Daneben wird durch die hohe Effektivität der antigenen Zellen nur eine geringe Anzahl ($2,5-5 \times 10^5$) benötigt.

Zur Spezifitätstestung der monoklonalen Antikörper wurden von allen zur Verfügung stehenden primären Hirntumoren Zellkulturen angelegt.

Zu Beginn beobachtet man eine relativ langsame Proliferation, da die Zellpopulation noch sehr heterogen und die Anpassung an die veränderten Lebensumstände noch nicht erfolgt ist. Dies tritt nach mehreren Passagen ein, gut anpassungsfähige Zellen beginnen zu überwiegen, und die Zeit zwischen zwei

Teilungen verkürzt sich. Ab der 11. Passage beginnt die Phase der langsamer werdenden Teilungen, bis die Zellen schließlich in der 18. Passage ihr Wachstum völlig einstellen. Dieses Verhalten ist ein gutes Beispiel für die Einflüsse, denen die Zellen in vitro ausgesetzt sind, und die dazu Anlaß geben sollten, das System Zellkultur trotz aller Vorteile immer wieder kritisch zu betrachten.

Durch die Zugabe von konditioniertem Medium konnten die Wachstumsbedingungen für humane Tumorzellkulturen verbessert werden. Die Zellen scheinen sich im Sinne eines Stoffaustausches mit dem Kulturmedium durch die Abgabe von löslichen Wachstumsfaktoren, die auch durch Einfrieren nicht an Wirksamkeit verlieren, selbst bessere Bedingungen schaffen zu können.

Am Beispiel der Hirntumorzellkultur N 63/85 (Abb. 5) konnte der Einfluß von db-cAMP gezeigt werden. Da die Adenylcyclase in der Zelle eine Kontrollfunktion über die Differenzierungsvorgänge einnimmt, hat eine in vitro-Behandlung mit db-cAMP differenzierungsähnliche morphologische Veränderungen an der Tumorzelle zur Folge. Neben einer Wachstumsdepression kommt es zur zusätzlichen Ausbildung von längeren und dünneren Fortsätzen. Dies soll jedoch zu einem Teil durch Schrumpfung und partielle Ablösung der Zelle bedingt sein (HAYNES und WELLER, 1977).

Ein im Vordergrund stehendes Anliegen bei der Produktion der monoklonalen Antikörper war, diese in Zukunft möglicherweise diagnostisch zu verwenden. Da als gesichert gilt, daß Hirntumorzellen tumorassoziierte Antigene an ihrer Oberfläche tragen, könnten diese mit Hilfe der monoklonalen Antikörper sichtbar gemacht werden. Aus diesem Grund wurde beim Testen der Klone und Subklone erhöhtes Gewicht auf die Ergebnisse des Indirekten Immunperoxidasetestes auf Tumorschnitten gelegt. In allen geprüften Hirntumorschnitten gab es Zellen, die von

den monoklonalen Antikörpern offensichtlich nicht erkannt wurden. Dies liegt in der Heterogenität eines Hirntumors begründet. Da Vorgänge wie Fixierung und Paraffineinbettung zu Veränderungen in der Zelloberflächenstruktur der Tumorzellen führen und damit, abhängig von der Antigenstabilität, falsche Ergebnisse verursachen können, wurde in einem Parallelversuch das Anfärbungsergebnis auf Bouin-, Karnovsky- bzw. Methanol/Aceton fixierten Geweben mit dem auf nativen und Aceton-fixierten Gefrierschnitten verglichen.

Wie erwartet war die Anzahl der angefärbten Zellen in den Gefrierschnitten sehr viel größer als die in den Schnitten paraffineingebetteten Hirntumorgewebes.

Offensichtlich verursacht die längere Fixierungszeit des Gewebstückes in Formalin, Bouin oder Karnovsky's Lösung eine bedeutsame Irritation der tumorassozierten Antigene.

Als weitere Regelmäßigkeit zeigte sich, daß die Zahl positiver Zellen in Geweben, die lange (bis zu 4 Tage) in Formalin fixiert worden waren, wesentlich niedriger war, als die der kurz mit Formalin oder Bouin'scher Lösung fixierten Tumorstücke. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die partielle Zerstörung der antigenen Determinanten an der Zelloberfläche durch die lange Fixierung zurückzuführen.

Aus den Ergebnissen der Immunofluoreszenz geht hervor, daß Aceton im Vergleich zur Fixierung mit Formalin, Glutaraldehyd und Bouin'scher Lösung das schonendste Fixierungsmittel für Zellen in Monolayern darstellt.

Zur Ermittlung des Erkennungsmusters von MUC 7-22 bis MUC 15-22 sind 31 Tumoren herangezogen worden. Besonderes Interesse galt der Stabilität der tumorassozierten Antigene. Hierbei wurden mehrere Beobachtungen gemacht, die alle darauf hindeuteten, daß die Zelloberflächenantigene gegenüber thermischen und chemischen Einflüssen sehr labil zu sein

scheinen. Der Hitzelabilität des Antigens wurde durch eine Spezialgewebeeinbettung mit Paraffin niedrigen Schmelzpunktes (45°C) Rechnung getragen.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Antikörperbindung an Gliomzellen in Monolayern, bei denen meist über 80% der Zellen erkannt wurden, erwies sich die Zellpopulation in Tumorschnitten als sehr heterogen. Offensichtlich erfolgt durch die in vitro-Züchtung eine Zellselektion. Nach einigen Passagen dominieren die Zellen mit hoher Proliferationsrate. Von allen angewandten Fixativa kann Methanol/Aceton als am geeignetsten angesehen werden. Aus diesen Überlegungen heraus wird verständlich, daß die Bindung der Antikörper an Zellen in Zellkulturen wesentlich homogener erscheint als in den Schnitten.

Die Gegenüberstellung der von den Klonen MUC 7-22 bis MUC 15-22 abgegebenen Antikörper ergab im Durchschnitt kaum graduelle Unterschiede. Die einzige Ausnahme bildete MUC 14-22, der in vielen der Tests deutlich schwächer reagierte.

Um die spezifische Bindungsfähigkeit der Antikörper an die Tumorzellen nachzuweisen, wurden mehrere Ansätze von Absorptionsversuchen gemacht. Wie schon von anderen Autoren (GALFRE et al., 1977, KOPROWSKI et al., 1978) gezeigt wurde, bestand auch hier eine direkte Korrelation zwischen der Zahl der zur Absorption fähigen Zellen und dem im Überstand verbliebenen Antikörperrest. Auch die von BECHTOL (1980c) beschriebene Prozone (Abb. 6) tritt in Erscheinung als Hinweis des optimalen Antigen-Antikörper-Verhältnisses und seinen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit. Als Vergleich wurde die Absorption der monoklonalen Antikörper MUC 7-22 bis MUC 15-22 an Zellen lyophilisierten Normalhirngewebes gemessen. Die vergleichsweise sehr flach verlaufende Kurve deutet auf ein Ausbleiben der spezifischen Antikörperbindung an die Normalhirnzellen hin.

Die subcutane Implantation von Tumormaterial bzw. Zellen aus Tumorkulturen führt nach den Angaben von BULLARD und BIGNER (1980), HORTEN et al. (1981) und YAMASHITA et al. (1981) bei immuninkompetenten BALB/c-nu/nu Nacktmäusen zu Tumorstadium. Unter Zugrundelegung der von uns erhobenen Befunde ist schwer zu klären, warum auch nach zusätzlicher Immunsuppression nur in einem Fall ein Tumor entstand. Offensichtlich waren die Tiere trotz ihrer Immundefizienz in der Lage, die fremden Antigene abzuwehren. Im allgemeinen ist die intracerebrale Inoculation der Tumorzellen hinsichtlich eines Tumorstadiums erfolgreicher als die subcutane (KIRCHNER, 1986).

An der Oberfläche von Tumorzellen werden Antigene gefunden, die normalerweise nur in einem frühen Stadium der Entwicklung des Organismus anzutreffen sind (OETTGEN, 1971). TROUILLAS (1972) bezeichnete diese den Astrozytomen, Glioblastomen und dem embryonalen Gehirn gemeinsamen Antigene als α_1 -Lipoprotein (Lit. bei SELL, 1985). Deshalb war es interessant, daß die monoklonalen Antikörper MUC 7-22 bis MUC 15-22 embryonale Zellen erkannten. Es müssen also antigene Determinanten vorliegen, die während der embryonalen Zeit exprimiert werden, und die auch an transformierten Gliazellen eines Erwachsenen anzutreffen sind.

Bei den von den Hybridomsubklonen MUC 7-22 bis MUC 15-22 produzierten monoklonalen Antikörpern handelt es sich um murine Proteine, da die Ursprungs-, Milz- und Myelomzellen aus dem Mausorganismus stammten. Da Fremdeiweiße im Organismus immer eine Immunreaktion hervorrufen, können die murinen Antikörper in vivo nur bedingt verwendet werden. Die murinen monoklonalen Antikörper können dennoch als Träger zytostatischer oder radioaktiv markierter Substanzen im Organismus angewendet werden, da bei Tumorstadien im allgemeinen eine Immundefizienz vorliegt.

F Zusammenfassung

Durch die Fusion zwischen Milzzellen einer immunisierten Maus und der Mausmyelomzelllinie X63-Ag8.653 wurden Hybridomzellen produziert. Als Immunogen dienten Einzelzellen aus frischem Hirntumormaterial, als Fusionsvermittler wurde Polyäthylenglycol (MG 1500) verwendet.

Von 264 Plattenvertiefungen enthielten nach 13 Tagen 151 Hybridome. 24 Klone produzierten gegen Hirntumorzellen gerichtete Antikörper. Nach mehreren Klonierungen wurden 6 Klone (MUC 7-22, MUC 8-22, MUC 10-22, MUC 11-22, MUC 14-22 und MUC 15-22) selektiert.

Die Spezifität der von diesen Klonen produzierten Antikörper wurde auf Monolayern von Hirntumorzellen und embryonalen Zellen, auf Paraffinschnitten von mit Karnovsky-, bzw. Bouin-Gemisch und Methanol/Aceton fixiertem Normalhirn- und Hirntumorgewebe, sowie auf nativen bzw. mit kaltem Aceton fixierten Gefrierschnitten von Hirntumorgewebe geprüft.

Diese nach dem Peroxidase/Antiperoxidase-Verfahren durchgeführten Tests ergaben, daß in der Regel nur transformierte Hirnzellen von den monoklonalen Antikörpern erkannt wurden.

In allen 31 untersuchten hirneigenen Tumoren wurde eine unterschiedlich große Anzahl von Zellen erkannt. Der Prozentsatz der von den Antikörpern erkannten Zellen schien von den Einbettungs- und Fixationsverfahren abhängig zu sein, so daß sich die tumorassoziierten Antigene als relativ labil gegenüber Umwelteinflüssen erwiesen. Die in den Hirntumorschnitten auffällige Heterogenität war in den Kulturen auch vorhanden, wenn auch weniger ausgeprägt.

Der Vergleich der Antikörperbindung an Zellen hirneigener Tumoren in nativen luftgetrockneten und mit kaltem Aceton fixierten Gefrierschnitten ergab geringfügige Unterschiede. Für Routineuntersuchungen sind native Gefrierschnitte allen anderen Verfahren zum Nachweis tumorassoziierter Antigene vorzuziehen.

Zur quantitativen Bestimmung der Antikörperbindungsspezifität an Hirntumorzellen wurden Absorptionsversuche unternommen. Hierbei zeigte sich, daß sich mit steigender Anzahl absorptionsfähiger Hirntumorzellen die im Überstand verbliebene Antikörpermenge verringerte. Als Vergleich diente lyophilisiertes Hirngewebe.

Der Gehalt an Immunglobulin in den Überständen betrug nach Ammoniumsulfatfällung durchschnittlich $51,5 \mu\text{g/ml}$ nativem Überstand. Mit Hilfe verschiedener Immunodiffusionstests konnten die Antikörper als IgG bzw. IgB_{2a} identifiziert werden.

6. Summary

Monoclonal antibodies against a human glioma

Hybridomas were produced by fusion between X63-Ag8.653 murine myeloma cells and spleen cells from an immunized mouse. Single cells from a fresh brain tumor tissue were used as immunogen, and polyethylene-glycol (MW 1500) was used as fusion mediator.

After 13 days, hybridomas had been obtained in 151 out of 264 wells. 24 clones producing antibodies against brain tumor cells were isolated. After several cloning procedures 6 clones (MUC 7-22, MUC 8-22, MUC 10-22, MUC 11-22, MUC 14-22, MUC 15-22) have been selected.

Antibodies produced by these 6 clones have been tested for specificity in monolayers of brain cells and embryonic cells, in paraffin-embedded sections from normal cerebral and brain tumor tissue fixed either by Karnovsky's method or in Bouin solution or in methanol-acetone, and in frozen sections from brain tumor tissue fixed in chilled acetone.

Tests performed by PAP technic have established that in no case untransformed brain cells were recognized by monoclonal antibodies. In all 31 brain tumors tested cells have been recognized in different quantities. Intensity of staining appeared to be dependent upon fixation and embedding procedures, the tumor associated antigens ostensibly being relatively sensitive to milieu influences. The heterogeneity strikingly present in sections from brain tumors was evident in monolayer cultures, too, although to a minor degree. Comparison between antibody binding to brain tumor cells in dried cryosections or in cryosections fixed in chilled acetone and antibody binding in paraffin embedded sections revealed higher numbers of stained cells in the cryosections. The differences between dried an acetone-fixed sections were slight. Our results

indicate that cryosections are well suited for routine examination.

Absorption tests have been carried out in order to arrive at a quantitative assessment of specificity of antibody binding to brain tumor cells. The tests have revealed that supernatant antibody quantities decreased with increasing number of brain tumor cells capable of absorption. Lyophilized brain tissue has been used as controls. After ammonium sulfate precipitation an average supernatant protein content of 51,5 $\mu\text{g/ml}$ has been established. In various immunodiffusion tests the antibodies have been identified as IgG_{2a} .

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander Stiftung (Sta-81.007.02) durchgeführt.

H. Literaturverzeichnis

ALLAN, P.M., J.A. GARSON, E.T. HARPER, U. ASSER,

H.B. COAKHAM, B. BROWNELL, J.T. KEMSHEAD:

Biological characterization and clinical application of a monoclonal antibody recognizing an antigen restricted to neuroectodermal tissues.

Int. J. Cancer 31, 591-598 (1983)

ANDERSON, R.J., C.M. McBRIDE, E.M. HERSH:

Lymphocyte blastogenic responses to cultured allogenic tumor cells in vitro.

Cancer Res. 32, 988-992 (1972)

ASADA, M., M. HIGUCHI, Y. KARAYJASHI, T. OSAWA:

Human T-cell hybridomas producing lymphokines.

Cell. Immunol. 77, 150-160 (1983)

ASHWOOD SMITH, M.J.:

Preservation of mouse bone marrow at 79°C with dimethylsulfoxide.

Nature (Lond.) 190, 1204-1205 (1961)

AX, W.:

Monoklonale Antikörper durch Lymphozytenhybridisierung.

Diagnose und Labor 35, 3-11 (1986)

BALDWIN, R.W., J.S. EMBLETON, P. JONES, S. LANGMAN:

Cell-mediated and tumoral immune reactions to human tumors.

Int. J. Cancer 12, 73-83 (1973)

BALDWIN, R.W., M.R. PRICE:

Nature and expression of tumor antigens associated with experimental animal and human tumors.

Ann. clin. Biochim. 13, 488 (1976)

BANSAL, S.C., H.O. SJÖGREN:

Effect of BCG on various facets of the immune response against polyoma tumors in rats.

Int. J. Cancer 11, 162-171 (1973)

BARALD, K.F., N.K. WESSELS:

Differential antigen adhevisity used to select spleen cells for the production of monoclonal antibodies to embryonic neurons.

J. Immunol. Method. 73, 1-15 (1984)

BARSKI, G., S. SORIEUL, F. CORNEFERT:

"Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains.

J. Nat. Cancer Inst. 26, 1269-1291 (1961)

BARTAL, A.H., C. FEIT, Y. HIRSHAUT:

The addition of insulin to HAT medium enhances hybridoma formation.

Develop. biol. Standard 57, 27-33 (1984)

BECHTOL, K.B.:

Quantitative absorption (blocking assay).

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.):
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980a

BECHTOL, K.B.:

Radioimmunassay.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.):
Monoclonal antibodies.
Plenum Press, New York, 1980b

BECHTOL, K.B., Z.L. JONAK, R.H. KENNETT:

Germ-cell-related and nervous-system-related differentiation and tumor antigens.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.):

Monoclonal antibodies.

Plenum Press, New York, 1980

BENDA, P., K. SOMEDA, J. MESSER, W.H. SWEET:

Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture.

J. Neurosurg. 34, 310-323 (1971)

BERNAL, S.D., M. MABRY, R.A. STAHEL, H.D. GRIFFIN, J.A. SPEAK:

Selective cytotoxicity of the SM 1 monoclonal antibody towards small cell carcinoma of the lung.

Cancer Res. 45, 1026-1032 (1985)

BIGBEE, J.W., D. BIGNER, Ch. BEGRAM, L. ENG:

Study of GFAP in a human glioma cell line grown in culture and as a solid tumor.

J. Neurochem. 40, 460-467 (1983)

BIGNER, D.D.:

The biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity.

Neurosurgery 9, 320-326 (1982)

BILZER, T.:

Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen gegen chemisch induzierte Gliome der Ratte.
Vet. Med. Dissertation, Universität München 1980

BJORN, M.J., D. RING, A. FRANKEL:

Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins.

Cancer Res. 45, 1214-1221 (1985)

BOROWITZ, M.J., R.B. STEIN:

Diagnostic applications of monoclonal antibodies to human cancer.

Arch. Path. Lab. Med. 108, 101-105 (1984)

BOYSE, E.A., L.J. OLD:

Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.

Ann. Rev. Genet. 3, 269-290 (1969)

BRADLEY, N.J., H.J.G. BLOOM, A.J.S. DAVIES, S.M. SWIFT:

Growth of human gliomas in immunodeficient mice:

a possible model for pre-clinical therapy studies.

Br. J. Cancer 38, 263-272 (1978)

BULLARD, D.E., D.D. BIGNER:

Animal models and virus induction of tumors.

In: D.G.T. Thomas and D.I. Graham (eds.): Brain tumors, scientific basis, clinical investigation and current therapy. Pergamon Press, New York, 1982

BURTIN, P., J. NARDELLI:

Monoclonal antibodies against human solid tumors.

Bull. Cancer (Paris) 70, 108-112 (1982)

CAIRNCROSS, J.G., M.J. MATTES, H.R. BERESFORD, A.P. ALBRINO, A.N. HOUGHTON, K.O. LLOYD, L.J. OLD:

Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies. Identification of astrocytoma subsets.

Proc. Natl. Sci. USA 79, 5641-5645 (1982)

CARELL, S., N. DE TRIBOLET, J.P. MACH:

Human melanoma- and glioma-associated antigen(s)
identified by monoclonal antibodies.

In: Methods of Cancer Research.

Academic Press, New York, 1982

CHEN, T.T.:

In situ detection of mycoplasma contamination in cell
cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain.

Exp. Cell. Res. 104, 255-262 (1977)

CHEN, T.T., J. MEALEY, R.L. CAMPBELL:

Quantitative cloning of malignant human glioma cells by
conditioned medium.

J. nat. Cancer Inst. 55, 1275-1280 (1975)

CHU, E.H.Y., J. STJERNSWÄRD, P. CLIFFORD, G. KLEIN:

Reactivity of human lymphocytes against autochthonous
and allogenic normal and tumor cells in vitro.

J. nat. Cancer Inst. 39, 595-617 (1967)

COAKHAM, H.B.:

Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.

Nature (Lond.) 250, 328-330 (1974)

COAKHAM, H.B., P.L. KORNBLITH, E.A. QUINDLEN, L.A. POLLOCK,
W.C. WOOD, L.C. HARTNETT:

Autologous humoral response to human gliomas and analysis
of certain cell surface antigens: In vitro study with the
use of microcytotoxicity and immune adherence assays.

J. nat. Cancer Inst. 64, 223-233 (1980)

COAKHAM, H.B., J.A. GARSON, P.M. ALLAN, E.I. HARPER,

B. BROWNELL, J.T. KEMSHEAD, E.B. LANE:

Immunohistological diagnosis of central nervous system
tumors using a monoclonal antibody panel.

J. Clin. Pathol. 38, 165-173 (1985)

COFFINO, P., R. BAUMAL, R. LASKOV, N.D. SCHARFF:
Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare
variants.

J. Cell Physiol. 79, 429-440 (1972)

CRAVIOTO, H., L. PALEKAR, E. WEISS, K. BENNETT:
Experimental neurinoma in tissue culture.

Acta Neuropathol. (Berlin) 21, 154-164 (1972)

CROCE, M.C., A. LINNENBACH, W. HALL, Z. STEPLEWSKI,
H. KOPROWSKI:

Production of human-human hybridomas secreting
antibodies to measles virus.

Nature (Lond.) 288, 488-489 (1980)

DAVIES, G., D. DUKE, A.G. GRANT, S.A. KELLY,
J. HERMON-TAYLOR:

Growth of human digestive-tumor xenografts in
athymic nude rats.

Br. J. Cancer 43, 53-58 (1981)

DEAN, C.J., L.A. GYVRE, J.M. STYLES, S.M. HOBBS,
S.M. NORTH, J.G. HALL:

Production of IgA secreting hybridomas: A monoclonal rat
antibody of the IgA class with specificity for RT 1^C.

J. Immunol. Meth. 53, 307-312 (1982)

DE LEIJ, L., S. POPPEMA, T.H. THE:

Cryopreservation of newly formed hybridomas.

J. Immunol. Meth. 62, 69-72 (1983)

DIPPOLD, W.G., K.O. LLOYD, L.T.C. LI, H. IKEDA ,
H.F. OETTGEN, L.J. OLD:

Cell surface antigens of human malignant melanoma:
Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal
antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118 (1980)

DOUILLARD, J.Y., T. HOFFMAN, R.B. HERBERMAN:
ELISA for screening monoclonal antibody production:
Use of intact vells as antigen.
J. Immunol. Meth. 39, 309-316 (1980)

DUFFY, P.E.:
Astrocytes: Normal, reactive and neoplastic.
Raven Press, New York

DÜRR, E.:
Etablierung von Interspezieshybridomen (Maus x Ratte)
und Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Rattenglome.
Vet. Med. Dissertation, Universität München, 1984

EDWARDS, P.A.W., C.M. SMITH, A.M. NEVILLE, M.J. O'HARE:
Human-human hybridoma system based on a fast growing
mutant of the ARH-77 plasma cell leukaemia-derived line.
Eur. J. Immunol. 12, 641-648 (1982)

EGGERS, A.E., C.A. HIBBARD, C.I. CIRIN, J.R. WUNDERLICH:
Chemical enhancement of tumor immunogenicity.
J. Immunol. 125, 1737-1744 (1980)

EGGERS, A.E., L. TARMIN, S. GINSBURG:
Use of covalently bound adjuvant peptide to increase
tumor immunogenicity.
Cancer Immunol. Immunother. 12, 167-172 (1982)

EISENBARTH, G.S.:
Application of monoclonal antibody techniques to
biochemical research.
Anal. Biochem. 111, 1-16 (1981)

FAZEKAS de ST. GROTH, S., D. SCHEIDEGGER:
Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics.
J. Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980a)

FAZEKAS de ST. GROTH, S.:

Monoclonal antibodies and how to make them.

Transplant. Proc. 12, 447-450 (1980b)

FISCHER, A.:

Observations of the division of sarcoma cells in vitro.

J. Cancer Res. 9, 71 (1925)

FISCHER, A.G., G. BROWN:

A rapid method of determining whether monoclonal antibodies react with the same of different antigens on the cell surface.

J. Immunol. Meth. 39, 377-385 (1980)

FOGH, J., B.C. GIOVANELLA:

The nude mouse in experimental and clinical research.

Academic Press, London (1978)

FOLEY, E.J.:

Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin.

Cancer Res. 13, 835-837 (1953)

GALFRÉ, G., S.C. HOWE, C. MILSTEIN:

Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.

Nature (Lond.) 266, 550-552 (1977)

GEARING, A.J.H., R. THORPE, L. SPITZ, M. SPITZ:

Use of "single shot" intrasplenic immunization for production of monoclonal antibodies specific for human IgM.

J. Immunol. Meth. 76, 337-343 (1984)

GEORGSSON, G., W. WEISSEL, C. THOMAS:

Zur Feinstruktur experimenteller Nerventumoren.

Z. Krebsforsch. 72, 12-23 (1969)

GERHARD, W., J. YEWDELL, M.E. FRANKEL, A.D. LOPES,
L. STAUDT:
Monoclonal antibodies against influenza virus.
In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.).
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

GODING, J.W.:
Conjugation of antibodies with fluorochromes:
modification to the standard methods.
J. Immunol. Meth. 13, 215-226 (1976)

GODING, J.W.:
Antibody production by hybridomas.
J. Immunol. Meth. 39, 295-308 (1980)

GRANT, A.G., D. DUKE, J. HERMON-TAYLOR:
Establishment and characterization of primary human
pancreatic carcinoma in continuous cell culture and
in nude mice.
Br. J. Cancer 39, 143-151 (1979)

GREENE, H.S.N., H. ARNOLD:
The homologous and heterologous transplantation of
brain and brain tumors.
J. Neurosurg. 2, 315-331 (1945)

HALLE, W.
Zell- und Gewebszüchtung bei Tieren.
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1976)

HARANAKA, K., N. SATOMI, A. SAKURA:
Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF)
against transplanted murine tumors and heterotransplanted
human tumors in nude mice.
Int. J. Cancer 34, 263-267 (1984)

HAUSHKA, T.S., B.J. KVEDAR, S.T. GRINELL, D.B. AMOS:
Immunoselection of polyploids from predominantly
diploid cell populations.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 683-710 (1956)

HAYNES, L.W., R.W. WELLER:

Induction of some features of glial differentiation in
primary cultures of human gliomas by treatment with
dibutyryl cyclic AMP.

Br. J. exp. Path. 59, 259-276 (1978)

HELLSTRÖM, I., K.E. HELLSTRÖM, G.E. PIERCE, A.H. BILL:
Demonstration of cell-bound and humoral immunity against
neuroblastoma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 60, 1231-1238 (1968)

HELLSTRÖM, K.E.; J.P. BROWN, I. HELLSTRÖM:

Monoclonal antibodies to tumor antigens.

Contemp. Top. Immunobiol. 11, 117-137 (1980)

HELLSTRÖM, I., K.E. HELLSTRÖM, H.O. SJÖGREN, G.A. WARNER:
Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms
of various histological types.

Int. J. Cancer 7, 1-16 (1971)

HENGARTNER, H., A.L. LUZZATI, M. SCHREIER:

Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X 63-Ag8.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 92-99 (1978)

HERLYN, D., H. KOPROWSKI:

IgG 2a monoclonal antibodies inhibit tumor growth through
interaction with effector cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4761-4765 (1982a)

HERLYN, M., H.F. SEARS, Z. STEPLEWSKI, H. KOPROWSKI:
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor
associated antigen.

J. Clin. Immunol. 2, 135-140 (1982b)

HERLYN, M., Z. STEPLEWSKI, D. HERLYN, H. KOPROWSKI:
Colorectal carcinoma specific antigen: Detection by
means of monoclonal antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1438-1442 (1979a)

HERLYN, D., M. HERLYN, Z. STEPLEWSKI, H. KOPROWSKI:
Monoclonal antibodies in cell mediated cytotoxicity
against human melanoma and colorectal carcinoma.

Eur. J. Immunol. 8, 657-659 (1979b)

HERLYN, D., B. ATKINSON, H. KOPROWSKI:
Monoclonal antibodies derived from immunosuppressed
mice grafted with human melanoma.

J. Immunol. Meth. 57, 155-164 (1983)

HERLYN, D., H. KOPROWSKI:
Monoclonal anticolon carcinoma antibodies in
complement-dependent cytotoxicity.

Int. J. Cancer 27, 769-774 (1981)

HERLYN, D., J. POWE, A. ALAVI, J. MATTIS, M. HERLYN,
C. ERNST, R. VAUM, H. KOPROWSKI:
Radioimmuno-detection of human tumor xenografts by
monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 2731-2735 (1983)

HERLYN, M., W.H. CLARK, M.J. MASTRANGELO, D. GUERRY,
D.E. ELDER, D. LAROSSA, R. HAMILTON, E. BONDI, R. TUTHILL,
Z. STEPLEWSKI, H. KOPROWSKI:

Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal
anti-melanoma antibodies to cultured cells and freshly
derived human cells.

Cancer Res. 40, 3602-3609 (1980b)

HERLYN, D., Z. STEPLEWSKI, M. HERLYN, H. KOPROWSKI:

Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice
by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 40, 717-721 (1980a)

HEWITT, H.B., E.R. BLAKE, A.S. WALDER:

A critique of the evidence for active host defense against
cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of
spontaneous origin.

Br. J. Cancer 33, 241 (1976)

HIRSCHHORN, K., F. BACH, R.L. KOLODNY, I.L. FIRSCHEIN,
N. HASHEM:

Immune response and mitosis of human peripheral blood
lymphocytes in vitro.

Science 142, 1185-1187 (1963)

HORTEN, B.C., G.A. BASLER, W.R. SHAPIRO:

Xenograft of human malignant glial tumors into brains
of nude mice. A histopathological study.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 493-511 (1981)

IRONSIDE, J.W.:

Paraganglioma of the cauda equina: A histological
ultrastructural and immunocytochemical study of two
cases with a review of the literature.

J. Pathol. 145, 195 (1985)

ISOBE, T., T. NAKAJIMA, T. OKUJAMA:

Reinvestigation of extremely acidic proteins in bovine brain.

Biochim. Biophys. Acta 494, 222 (1977)

JACQUE, C.M., C. VINNER, M. KUJAS, M. RAOUL, J. RACADOT, N.A. BAUMANN:

Determination of GFAP in human brain tumors.

J. Neurol. Sci. 35, 147-155 (1978)

JONAK, Z.L.:

Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.).

Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

JONES, T.R., S.H. BIGNER, S.C. SCHOLD, L.F. ENG, D.D. BIGNER:
Anaplastic human gliomas in athymic mice. Morphology and GFAP expression.

Am. J. Pathol. 105, 316-327 (1981a)

KAPLAN, H.S., L. OLSSON:

Human-human hybridomas in diagnosis and treatment.

In: M.S. Mitchel, H.F. Oettgen (eds.). Hybridomas in cancer diagnosis and treatment.

Raven Press, New York 1982

KEARNEY, J.F., A. RADBRUCH, B. LIESEGANG, K. RAJEWSKY:

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.

J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

KELLER, R.:

Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells in vitro by non-specifically activated macrophages.

J. Exp. Med. 138, 625-644 (1973)

KEMSHEAD, J.T., J. FRITSCHY, A. GOLDMANN, J.S. MALPAS, J. PRITCHARD:

Use of panels of monoclonal antibodies in the differential diagnosis of neuroblastoma and lymphoblastic disorders.

Lancet 8, 11-12 (1983)

KEMSHEAD, J.T., J. FRITSCHY, J.A. GARSON, P. ALLAN, H. COAKHAM, S. BROWN, U. ASSER:

Monoclonal antibody UJ 127:11 detects a 220 000-240 000 kdal glycoprotein present on a sub-set of neuroectodermally derived cells.

Int. J. Cancer 31, 187-195 (1983)

KEMSHEAD, J.T., F. WALSH, R. PRITCHARD, M. GREAVES:

Monoclonal antibody to ganglioside GQ discriminates between haemopoietic cells and infiltrating neuroblastoma tumor cells in bone marrow.

Int. J. Cancer 27, 447-452 (1981a)

KEMSHEAD, J.T., D. BICKNELL, M. GREAVES:

A monoclonal antibody detecting an antigen shared by neural and granulocytic cells.

Pediatr. Res. 15, 1282-1286 (1981b)

KENNETT, R.H.:

Monoclonal antibody-hybridomas: A new dimension in biological analysis.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.).
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1980

KENNETT, R.H., K.A. DENIS, A.S. TUNG, N.R. KLINMAN:
Hybrid plasmacytoma production: Fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 77-91 (1978)

KENNETT, R.H., F. GILBERT:

Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.

Science 203 , 1120-1121 (1979)

KENNETT, R.H., Z.L. JONAK, K.B. BECHTOL:

Monoclonal antibodies against human tumor associated antigens.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.).
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

KERSTING, G.:

Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.

Springer Verlag, Berlin 1961

KIAER, S.:

Cultures of adult tissues in homologous and heterologous medium.

Arch. exp. Zellforsch. 1, 115 (1925)

KIM, S.U., G. MORETTO, B. RUFF, D.H. SHIN:

Culture and cryopreservation of adult human oligodendrocytes and astrocytes.

Acta Neuropathol. (Berlin) 64, 172-175 (1984)

KIM, S.U., Y. SATO, D.H. SILBERBERG, D.E. PLEASURE,
L. RORKE:

Long term culture of human oligodendrocytes. Isolation,
growth and identification.

J. Neurol. Sci. 62 , 295-301 (1984)

KIRCHNER, H.H., C. FONATSCH, A. ENGERT, H. POLIWODA:
Chemotherapy of human lymphoma cell lines after
heterotransplantation in nude mice.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. (Suppl.) 111, 104 (1986)

KLEBE, R.J., M.G. MANCUSO:
Chemicals which promote cell hybridisation.

Somat. Cell Genet. 7, 473-488 (1981)

KLEIN, G.:

Tumor immunology.

In: F.H. Bach, R.H. Good (eds.). Clinical immunobiology.
Academic Press, New York, 1972

KNUTTON, S., C.A. PASTERNAK:
The mechanism of cell-cell fusion.

Trends Biochem. Science 4, 220-223 (1979)

KÖHLER, G., C. MILSTEIN:
Continuous cultures of fused cells secreting antibody
of predefined specificity.

Nature (Lond.) 256, 495-497 (1975)

KÖHLER, G., M.J. SHULMAN:
Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte
fusion.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-151 (1978)

KÖHLER, G.:

Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2197-2199 (1980)

KOPROWSKI, A., Z. STEPLEWSKI, D. HERLYN, M. HERLYN:

Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3405-3409 (1978)

KORNBLITH, P.L., F.C. DOHAN, W.C. WOOD, B.O. WHITMAN:

Human astrocytoma serum mediated immunologic response.

Cancer 33, 1512-1519 (1974)

KUMMER, U., E. THIEL, I. DOXIADIS, M. EULITZ,

S. SLADOLJEV, S. THIERFELDER:

Tritium radiolabelling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl (2,3-³H)propionate: use in detecting monoclonal antibodies.

J. Immunol. Meth. 42, 367-374 (1981)

LANDSROP, P.M., G.C.B. ASTALDI, F. OOSTERHOF,

M.C. JANSSEN, W.P. ZEIJLEMAKER:

Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of individual cells.

J. Immunol. Meth. 39, 393-405 (1980)

LEFKOVITS, I., H. WALDMANN:

Limiting dilution analysis of cells in the immune system.

Trends Biochem. Science 64, 172-175 (1984)

LEFKOVITS, I.:

Introduction of antibody forming cell clones in micro cultures.

Eur. J. Immunol. 2, 360-366 (1972)

LEMONNIER, F., S.J. BURAKOFF, R.N. GERMAIN, B. BENACERRAF:

Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 74, 1229-1233 (1977)

LERNHARDT, W., J. ANDERSON, A. CONTINHO, F. MELCHERS:

Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%.

Exp. Cell Res. 111, 309-316 (1978)

LEVY, R., J. DILLEY, L.A. LAMPSON:

Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal antibodies as probes.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 164-169 (1978)

LEVY, R., J. DILLEY:

Rescue of immunoglobulin secretion from human neoplastic lymphoid cells by somatic cell hybridisation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2411-2415 (1978)

LIBERT, A., G. GHANEM, R. ARNOULD, A. VERCAMMEN-

GRANDJEAN, S. CARELL, F. LEJEUNE:

Monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens: Study of their specificity and visualisation at the cellular level of the antigenic distribution.

Anticancer Res. 3, 219-226 (1983)

LISAK, R.P., D.E. PLEASURE, D.H. SILBERBERG, M. MANNING, T. SAIDA:

Long term culture of bovine oligodendroglia isolated with a Percoll gradient.

Brain Res. 223, 107-122 (1981)

LISS, L.:

The use of tissue cultures in the study of brain tumors.
Progr. Exp. Tumor Res. (Basel) 17, 93-110 (1972)

LITTLEFIELD, J.W.:

Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.
Science 145, 709-710 (1964)

LOHMANN-MATTES, M.L., F.G. ZIEGLER, H. FISCHER:

Macrophage cytotoxicity factor. A product of in vitro sensitized thymus-dependent cells.

Eur. J. Immunol. 3, 56-58 (1973)

LUBEN, R.A., P. BRAZEAU, P. BÖHLEN, R. GUILLEMIN:

Monoclonal antibodies to hypothalamic growth hormone-releasing factor with picomoles of antigen.

Science 218, 887-889 (1982)

LUMSDEN, C.E.:

Tissue culture in relation to tumors of the nervous system.
In: S. Russell, E. Arnold (eds.). Pathology of tumors of the nervous system. Academic Press, New York, 1963

MACDONALD, I.M., L.J. DUMBLE, I. JACK, G.J.A. CLUNIE:

Inhibition of whole blood antibody dependent cellular cytotoxicity by heat aggregated human IgG.

J. Immunol. Meth. 46, 69-76 (1981)

MACINTYRE, E.H., C.J. WINTERSGILL:

The responses in culture of human tumors astrocytes and neuroblasts to N⁶, O²-dibutyryl-adenosine 3',5'-monophosphoric acid.

J. Cell. Sci. 11, 639-667 (1972)

MADERSPACH, K., T. PARKAS:

The effect of catecholamines on cell motility in mouse fibroblasts.

Life Sci. 12, 413-418 (1973)

MANUELIDIS, E.E.:

Heterologous transplantation of two tissue culture lines of glioblastoma multiforme.

Proc. Sci. Exp. Biol. Med. 107, 636-639 (1961)

MANUELIDIS, E.E.:

Long-term lines of tissue culture of intracranial tumors.

J. Neurosurg. 22, 368-373 (1965)

MANUELIDIS, E.E.:

Experiments with tissue culture and heterologous transplantation of tumors.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 409-431 (1969)

MARCUS, P.I., S.J. CIECIURA, T.T. PUCK:

Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.

J. Exp. Med. 104, 615 (1956)

MASTRANGELO, M.J., D. BERD, H.C. MAGUIRE:

Current condition and prognosis of tumor immunotherapy: A second opinion.

Cancer Treatm. Rep. 68, 207-219 (1984)

MASUKO, T., H. YAGITA, Y. HASHIMOTO:

Monoclonal antibodies against cell surface antigens present on human urinary bladder cancer cells.

J. Natl. Cancer Inst. 72, 523-530 (1984)

MATTHEWS, P.N., A.G. GRANT, H. HERMON-TAYLOR:
The growth of human bladder and kidney cancers as
xenografts in nude mice and rats.

Urol. Res. 10, 293 (1982)

MAVER, C., M. McKNEALLY:

Preparation of autologous tumor cell vaccine from
human lung cancer.

Cancer Res. 39, 3276 (1979)

MAZUMDER, A., E.A. GRIMM, H.Z. ZHANG, S.A. ROSENBERG:
Lysis of fresh human solid tumors by autologous
lymphocytes activated in vitro with lectins.

Cancer Res. 42, 913-918 (1982)

McKEARN, T.J.:

Method for growing hybridomas in rats or mice.

In: R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (eds.):
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

MELCHERS, F.:

How to produce antigen specific antibodies in tissue
culture.

J. Cell. Physiol. (Suppl.) 2, 107-116 (1982)

MEULEN, van der, J.D.M., H.J. HONTHOFF, E.J. EBELS:
GFAP in human gliomas.

Neuropath. Appl. Neurobiol. 4, 177-190 (1978)

MINNA, J.D., F. CUTTITTA, S. ROSEN, P.A. BUNN,
D.N. CARNEY, A.F. GAZDAR, S. KRASNOW:

Methods for production of monoclonal antibodies with
specifity for human lung cancer cells.

In Vitro 17, 1058-1070 (1981)

MISHELL, B.B., S.M. SHIIGI:

Selected methods in cellular immunology.
Freeman and Company, San Francisco 1980

MOLDENHAUER, G., D. HAUSTEIN, T. HÜPPE, A. WAGNER,
K.-U. HARTMANN:

A new murine cell surface differentiation antigen (Leugp 90)
defined by rat monoclonal antibody: cellular distribution
and biochemical characterization.

J. Immunol. 128, 2664-2669 (1982)

MOORE, B.W.:

A soluble protein characteristic of the nervous system.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739 (1965)

MORANTZ, R.A., G.W. WOOD:

Macrophages in experimental and human brain tumors.
J. Neurosurg. 50, 298-304 (1979)

MURAKAMI, H., H. MASUI, G.H. SATO, N. SUEOKA, T.P. CHOW,
T. KANO-SUEOKA:

Growth of hybridoma cells in serum free medium.
Ethanolamine is an essential component.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1158-1162 (1982)

NAMBA, M., K. NISHITANI, F. HYODOII, F. FUKUSHIMA,
T. KIMOTO:

Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts
(KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma rays.

Int. J. Cancer 35, 275-280 (1985)

NATHRATH, W.B.J.:

Organ and tumors antigens in malignant disease:
A review.

J. Royal Society Medicine 71, 755-761 (1978)

NEWBOLD, B.B.:

Production of allergic encephalomyelitis in rats by injections of spinal cord adjuvant into the inguinal lymphnodes.

Immunology 9, 613-614 (1965)

NEXØ, B.A.:

A plaque assay for murine leukemia viruses using enzyme-coupled antibodies.

Virology 77, 849-852 (1977)

NORTH, S.M., I.M. STYLES, S.M. HOBBS, C.J. DEAN:

Monoclonal antibodies to rat sarcoma: Immunization procedures and source of lymphoid cells for hybridoma production.

Immunology 47, 397-405 (1982)

OETTGEN, H.F., L.J. OLD, E.A. BOYSE:

Human tumor immunology.

Med. Clin. N. Amer. 55, 761-785 (1971)

OETTGEN, H.F.:

Immunologische Aspekte des Krebses.

In: H.-W. Altmann, F. Buchner, H. Coffier (Hrsg.):

Handbuch allgemeine Pathologie.

Springer Berlin, Heidelberg, New York 1974

OI, V.T., P.P. JONES, J.W. GODING, L.A. HERZENBERG:

Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes H-2, and Ia-antigens.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 115-129 (1978)

OLDSTONE, M.B.A., F.J. DIXON:

Acute viral infection: tissue injury mediated by anti-viral antibody through a complement effector system.

J. Immunol. 107, 1274-1280 (1971)

OLSNES, S., A. PIHL:

Chimeric toxins.

Pharmacol. Ther. 15, 335-381 (1982)

OLSSON, L., H.S. KAPLAN:

Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5429-5431 (1980a)

OLSSON, L., H.S. KAPLAN:

Human-human monoclonal antibody-producing hybridomas: technical aspects.

Meth. Enzymol. 92, 3-16 (1983)

OLSSON, L., H. KRONSTRØM, A. CAMBON-DeMOUZON, C. HONSIK, T. BRODIN, B. JAKOBSEN:

Antibody producing human-human hybridomas.

I. Technical aspects.

J. Immunol. Meth. 61, 17-32 (1983)

OLSTAD, R., G. KAPLAN, R. SELJELID:

In vitro cytotoxicity of mouse macrophages activated by coculture with syngeneic sarcoma cells.

Scand. J. Immunol. 16, 421-430 (1982)

ONVORA, L.O.:

Early stages of experimental brain tumors in the rat.

Thesis, Universität Leipzig 1973

OSTERKAMP, U.:

Etablierung und partielle Charakterisierung von Langzeitkulturen experimenteller neurogener Tumoren der Ratte. Vet. Med. Dissertation, Universität München, 1977

OUCHTERLONY, Ö.:

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)

PALFREYMAN, J.W., D.G.T. THOMAS, J.G. RATCLIFFE, D.I. GRAHAM:

Glial fibrillary acidic protein (GFAP). Purification from human fibrillary astrocytoma, development and validation of a radioimmunoassay for GFAP-like immuno-activity.

J. Neurol. Sci. 41, 101 (1979)

PARDUE, R.L., R.C. BRADY, G.W. PERRY, J.R. DEDMAN: Production of monoclonal antibodies against calmodulin by in vitro immunization of spleen cells.

J. Cell Biol. 96, 1149-1154 (1983)

PARKS, D.R., V.M. BRYAN, V.T. OI, L.A. HERZENBERG:

Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1962-1966 (1979)

PARSHAD, R., K.K. SANFORD:

Effect of horse serum, fetal calf serum and bovine serum on neoplastic conversion and chromosomes of mouse embryo cells in vitro.

J. Natl. Cancer Inst. 41, 767-779 (1968)

PATERAKI, E., J.L. GUESDON, C. SERVIE, S. AVRAMEAS:
Ter-ELISA: The ELISA-test performed in Terasaki plates.
J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)

PAUL, J.:
Zell- und Gewebekulturen.
W. de Gruyter Verlag, New York 1980

PERESE, D.M., G.E. MOORE:
Methods of induction and histogenesis of experimental
brain tumors.
J. Neurosurg. 17, 677-698 (1960)

PETERS, L.C., J.S. BRANDHORST, M.G. HANNA:
Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell
vaccines from solid tumors.
Cancer Res. 39, 1353-1360 (1979)

PETERSON, A., E. WALUM:
Growth and morphology of neuronal cell lines cultured
in perfusion.
In Vitro 19, 875-879 (1983)

PHILLIPS, J.P., O. EREMIN, J. ANDERSON:
Lymphoreticular cells in human normal brain and in
brain tumors.
J. Neurol. Sci. 51, 163-171 (1981)

PICKERING, J., F. GELDER:
A human myeloma cell line that does not express
immunoglobulin, but yields a high frequency of
antibody-secreting hybridomas.
J. Immunol. 129, 406-412 (1982)

PINKUS, H.:

Pure culture of human tumor cells.

Michigan Univ. Hosp. Bull. 1, 41-50 (1935)

PLAIN, M.J., R.H. WHITEHEAD, D.G. JOSE:

Immunity to melanoma associated antigens detected by both leukocyte adherence inhibition and antibody dependent cellular cytotoxicity assays.

Pathology 15, 177 (1983)

PONTEN, J., E.H. MACINTYRE:

Long term culture of normal and neoplastic human glia.

Acta path. microbiol. scand. 74, 465-486 (1968)

POSNER, M.R., D. ANTONIOU, J. GRIFFIN, S.F. SCHLOSSMAN, H. LAZARUS:

An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.

J. Immunol. Meth. 48, 23-31 (1982)

POTTER, M.:

Antigen binding myeloma proteins of mice.

Adv. immunol. 25, 141-211 (1978)

PREHN, R.T.:

Relationship of tumor immunogenicity to concentration of the oncogen.

J. Natl. Cancer Inst. 55, 189 (1975)

RAJU, T., A. BIGNAMI, D. DAHL:

Glial fibrillary acidic protein in monolayer cultures of C 6 glioma cells: effect of aging and db-CMP.

Brain Res. 200, 225-230 (1980)

REINHERZ, E.L., P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN, S.F. SCHLOSSMAN:

Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4061-4065 (1979)

RENKAWEK, K., H. KROH, Z. KRASNICKA:

Experimental gliomas cultured in vitro: Morphological and histochemical study.

Z. Krebsforsch. 77, 247-256 (1972)

RIDLEY, A., J.B. CAVANAGH:

Lymphocytic infiltration in gliomas. Evidence of possible host resistance.

Brain 94, 117-124 (1971)

RUBINSTEIN, L.J.:

Tumors of the central nervous system. Experimental tumors of the nervous system.

In: Atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology Washington D.C., 1982

RYGAARD, P.R., I. POVESEN:

Heterotransplantation of human malignant tumor to nude mice.

Acta path. microbiol. scand. 77, 758 (1969)

SCHIMMELPFENG, L., U. LANGENBERG, H. PETERS:

Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro.

Nature (Lond.) 285, 661-662 (1980)

SCHLOM, J., D. WUNDERLICH, Y.A. TERAMOTO:

Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6841-6845 (1980)

SCHNEGG, J.F., A.C. DISERENS, S. CARELL, R.S. ACCOLIA,
N. DE TRIBOLET:

Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981b)

SCHNEGG, J.F., N. DE TRIBOLET, A.C. DISERENS,
A. MARTIN-ACHARD, S. CARELL:

Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum.

Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981a)

SCHNEIDERMAN, S., L. FABER, R. BASERGA:

A simple method for decreasing the toxicity of polyethyleneglycol in mammalian cell hybridisation.

Somatic Cell Genet. 5, 263-269 (1979)

SCHWABER, J., E.P. COHEN:

Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types.

Nature (Lond.) 244, 444-447 (1973)

SCHWABER, J.:

Immunoglobulin production by a human-mouse somatic cell hybrid.

Exp. Cell. Res. 93, 343-354 (1975)

SECHER, D.:

Monoclonal antibodies by cell fusion.

Immunol. today 2, 22-26 (1980)

SELL, S.:

Monoclonal Antibodies to Alphafetoprotein and Regulation of
AFP Gene Expression.

in: Monoclonal Antibodies in Cancer , Clifton, New Jersey, 1985

SHAPIRO, W.R., G.A. BASLER, N.L. CHERNIK, J.B. POSNER:

Human brain tumor transplantation into nude mice.

J. Natl. Cancer Inst. 62, 447-453 (1979)

SHARMA, B., P.I. TERASAKI:

In vitro immunization to cultured human tumor cells.

Cancer Res. 34, 115-118 (1974a)

SHARMA, B., P.I. TERASAKI:

Immunization of lymphocytes from cancer patients.

J. Natl. Cancer Inst. 52, 1925-1926 (1974b)

SHARMA, B., D.G. TUBERGEN, P. MINDEN, M.J. BRUNDA:

In vitro immunization against human tumor cells with
bacterial extracts.

Nature (Lond.) 267, 845-847 (1977)

SHARMA, B., O. KOHASHI, M.R. MICKEY, P.I. TERASAKI:

Effect of water-soluble adjuvants on in vitro
lymphocyte immunization.

Cancer Res. 35, 666-669 (1975)

SHEIKH, K.M., M.L. APUZZO, K.R. KOCHSIEK, M.H. WEISS:

Malignant glialneoplasms: Definition of a humoral
host response to tumor associated antigens.

Yale J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)

SIKORA, K., J. PHILLIPS:

Human monoclonal antibodies to glioma cells.

Br. J. Cancer 43, 105-107 (1981)

SIKORA, K., T. ALDERSON, J. PHILLIPS, J.V. WATSON:

Human hybridomas from malignant gliomas.

Lancet 1, 11-14 (1982)

SOUTHAM, C.M., A. BEUNTSCHWIG:

Quantitative studies of autotransplantation of human cancer.

Cancer 14, 971-978 (1961)

SPENCE, A.M., K.E. HELLSTRÖM, I. HELLSTRÖM, G. VAN BELLE, K. SULLIVAN, T. WAHLSTRÖM:

Immunization against ethylnitrosurea-induced antiochthonous neurogenic rat tumors.

Brit. J. Cancer 40, 164-167 (1979)

SPITZ, M., L. SPITZ, R. THOPE, E. EUGUI:

Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies.

J. Immunol. Meth. 70, 39-43 (1984)

STAVROU, D.:

Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte.

I. Morphologische Befunde.

Acta Neuropathol. (Berlin) 15, 220-230 (1970)

STAVROU, D., B. SCHRÖDER, U. OSTERKAMP, E. DAHME:
Beitrag zur Morphologie experimenteller Tumoren des
peripheren Nervensystems unter besonderer Berücksichtigung
ultrastruktureller Befunde.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 109-113 (1977a)

STAVROU, D., A.P. ANZIL, W. WEIDENBACH, H. RODT:
Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in Gliomas.
J. Neurol. Sci. 33, 275-282 (1977c)

STAVROU, D., M. HULTEN, T. BILZER:
Chemical modification and antigenicity of glioma cells.
Acta Neuropathol. (Suppl.) VII, 75-78 (1981)

STAVROU, D., C. SÜSS, T. BILZER, U. KUMMER, N. DE TRIBOLET:
Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines
derived from experimental brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

STAVROU, D., C. SÜSS, T. BILZER, U. KUMMER, N. DE TRIBOLET:
Glioma associated antigens detected by monoclonal
antibodies.
Anticancer Res. 4, 15-18 (1984)

STAVROU, D., W. MELLERT, T. BILZER:
Radioimmunodetection of gliomas by administration
of radiolabelled monoclonal antibodies. Experimental data.
Anticancer Res. 5, 147-156 (1985)

STAVROU, D., W. MELLERT, T. BILZER, R. SENEKOWITSCH,
E. KEIDITSCH, P. MEHRAEIN:
Localization of experimental glioma grafts by means of
iodinated monoclonal antibodies and radionuclide imaging.
Acta Neuropathol. (Berlin) 66, 340-342 (1985)

STEFANSSON, K., R.L. WOLLMANN, B.W. MOORE, B.G.W. ARNASON:
S 100 protein in human chondrocytes.
Nature (Lond.) 295, 63-64 (1982)

STEINECKE, M.:
Intraspezieshybridome (Ratte x Ratte) und ihre Eignung
zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Rattengliome.
Vet. Med. Dissertation, Universität München, 1984

STOCKER, J.W., C.H. HEUSSER:
Methods for binding cells to plastic: Application to a
solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens.
J. Immunol. Meth. 26, 87-95 (1979)

STRIKE, L.E., B.H. DERENS, R.L. LUNDAL:
Production of human-human hybridomas secreting antibody
to sheep erythrocytes after in vitro immunization.
J. Immunol. 132, 1798-1803 (1984)

STUDER, A., N. DE TRIBOLET, A.C. DISERENS, A.C. GAIDE:
Characterization of four human malignant glioma cell lines.
Acta Neuropathol. (Berlin) 66, 208-217 (1985)

SÜSS, C.:
Produktion monoklonaler Antikörper gegen experimentelle
Gliome durch Fusion von Mausmyelomzellen und Maus-
splenozyten.
Vet. Med. Dissertation, Universität München, 1983

SUTER, L., J. BRÜGGEN, C. SORG:
Use of an ELISA for screening of hybridoma antibodies
against cell surface antigens.
J. Immunol. Meth. 39, 407-411 (1980)

TAKAHASHI, K., H. YAMAGUSHI, J. ISHIZEKI, T. NAKAJIMA,
Y. NAKAZATO:

Immunohistochemical and immunoelectron microscopic
localization of S 100 protein in the interdigitating,
reticulum cell of the human lymph node.

Virchows Arch. (Cell Pathol.) 37, 125-135 (1981)

TAKASUGI, M., M.R. MICKEY, P.I. TERASAKI:

Reactivity of lymphocytes from normal persons on
cultured tumor cells.

Cancer Res. 33, 2898-2902 (1973)

THUST, R.:

Langzeitkulturen experimenteller Tumoren des Zentral-
nervensystems als Modelle für neuroonkologische Forschung.

Zbl. Allg. Path. 120, 274-283 (1976)

TISCHLER, A.S., V.M. SLAYTON, D.L. COSTOPOULOS,
L.L. LEAPE, R.A. DELELLIS, H.J. WOLFE:

Nerve growth factor may function as a survival factor
for human neuroblastoma cells in culture.

Cancer 54, 1344-1347 (1984)

TRIBOLET de, N., S. CARELL:

Human glioma-associated antigens.

Cancer Immunol. Immunother. 9, 207-211 (1980)

TROUILLAS, P.:

Immunologie des tumeurs cérébrales. L'antigène carcino-
foetal glial.

Ann. Inst. Pasteur Lille 122, 819 (1972)

UNSICKER, K., J. VEY, H.D. HOFMANN, T.H. MÜLLER,
A.J. WILSON:

C 6 glioma cell-conditioned medium induces neurite
outgrowth and survival of rat chromaffin cells in vitro:
Comparison with the effects of nerve growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2242-2246 (1984)

WAGNER, H., M. ROLLINGHOFF:

In vitro induction of tumor-specific immunity.
J. Exp. Med. 138, 1-15 (1973)

WALTON, J., D. WINTERBOURNE, A. FIENNES, P. HARRIS,
J. HERMON-TAYLOR, A. GRANT:

Human tumor cell lines established in vitro from tumors
after long-term passage as nude mouse xenografts.
Comparative fingerprinting of their Concana-
valin-A acceptor glycoproteins.
Br. J. Cancer 51, 675-680 (1985)

WANG, L., C. HEXTER, M. INBAR:

Immunoengineering of a hybrid myeloma producing to
monoclonal antibodies simultaneously.
In: R.F. Beers, E.G. Bassett (eds.): Cell fusion:
Gene transfer and transformation.
Raven Press, New York 1984

WARENIUS, H.M., I.W. TAYLOR, B.E. DURACK, P.A. CROSS:
The production of human hybridomas from patients with
malignant melanoma. The effect of pre-stimulation of
lymphocytes with Pokeweed mitogen.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 347-355 (1983)

WARNATZ, H.:

Tumorimmunologie.
Thieme, Stuttgart 1975

WECHSLER, W., S.E. PFEIFFER, J.A. SWENBERG, A. KOESTNER:
S 100 protein in methyl- and ethylnitrosurea-induced
tumors of the rat nervous system.

Acta Neuropathol. (Berlin) 24, 287-303 (1973)

WEISS, D.W.:

The questionable immunogenicity certain neoplasms:
What then the prospects for immunological intervention
in malignant disease?

Cancer Immunol. Immunother. 2, 11 (1977)

WEISS, D.W.:

Tumor origin, progression, immunogenicity and
immunotherapy.

Transplant. Proc. 16, 528-533 (1984)

WESTERWOUTD, R.J., A.M. MAIPAL, C.M.H. HARRISSON:
Improved fusion technique. II. Stability and purity
of hybrid clones.

J. Immunol. Meth. 68, 89-101 (1984)

WIKSTRAND, C.J., S.H. BIGNER, D.D. BIGNER:
Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a
human glioma cell line and eight derived clones by
specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

WIKSTRAND, C.J., D.D. BIGNER:

Immunobiologic aspects of the brain and human gliomas.

Am. J. Path. 98, 517-567 (1980)

WIKSTRAND, C.J., D.D. BIGNER:

Expression of human fetal antigens by human tumors of neuro-
ektodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

WIKSTRAND, C.J., M.S. MAHALEY, D.D. BIGNER:

Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

WOOSLEY, R.E., M.S. MAHALEY, J.L. MAHALEY, G.M. MILLER, W.H. BROOKS:

Microcytotoxicity assays of specific immune responses of brain tumor patients.

J. Neurosurg. 47, 871-885 (1977)

WUNDERLICH, J.R., T.G. CANTY:

Cell mediated immunity induced in vitro.

Nature (Lond.) 228, 62-63 (1970)

YAMASHITA, M., H. EGAMI, H. MANNOJI, M. OHTA, K. KITAMURA:

Alternative culture and animal passage of human gliomas.

Acta Neuropathol. (Berlin) 53, 35-40 (1981)

YATES, A.J., R.E. STEPHENS, P.J. ELDER, D.L. MARKOWITZ, J.M. RICE:

Effects of interferon and gangliosides on growth of cultured human glioma and fetal brain cells.

Cancer Res. 45, 1033-1039 (1985)

YEH, M.Y., I. HELLSTRÖM, J.P. BROWN, G.A. WARNER, J.A. HANSEN, K.E. HELLSTRÖM:

Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2927-2931 (1979)

YELTON, D.E., B.A. DIAMOND, S.P. KWAN, M.D. SCHARFF:
Fusion of mouse myeloma and spleen cells.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7 (1978)

YELTON, D.E., D.H. MARGULIES, B. DIAMOND, M. SCHARFF:
Plasmacytomas and hybridomas.
In: R.H. Kennett, T.H. McKearn, K.B. Bechtol (eds.):
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

YEN, A., D. LEWIN:
Uncoupling lymphocyte proliferation from differentiation:
dissimilar dose-response relations for Pokeweed mitogen-
induced proliferation and differentiation of normal
human lymphocytes.
Cell. Immunol. 61, 332-342 (1981)

YOUNG, H.F., A. KAPLAN:
Immunotherapy of human gliomas.
In: H. Waters (ed.): The handbook of cancer immunology.
Garland STPN Press, New York 1978

Bei allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Bei der Realisierung der Experimente waren mir Frau D. Wallmann und Frau B. Stochdorph eine unschätzbare Hilfe.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. E. Keiditsch, Chefarzt des Institutes für Pathologie des Krankenhauses München Bogenhausen, bedanken, der mir ermöglichte, die Experimente in seinem Institut durchzuführen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, ebenso wie die Damen des Histologielabors, insbesondere Frau A. Szabo und Frau A. Toth.

Mein Dank geht ebenfalls an Herrn Dr. F. Schmidtberger, Chefarzt der Neurochirurgischen Abteilung des Krankenhauses München Bogenhausen, und Herrn Dr. V. Fleischmann für deren organisatorische Hilfe.

Frau W. Schröder danke ich für die ausgezeichnete, sorgfältige und sachverständige Durchführung der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

- 1960 geboren am 2. August in Kiel
- Mutter: Dr. med. Hella Staemmler
geb. Froehlich, Ärztin
- Vater: Prof. Dr. med. Hans-Joachim
Staemmler, Arzt
- 1966-1970 Besuch der Grundschule in Kiel und
Ludwigshafen/Rhein
- 1970-1979 Besuch des Staatlichen Theodor-Heuss-
Gymnasiums in Ludwigshafen/Rhein
- 1979 12. Juni Reifezeugnis
- 1979 2. November Beginn des Studiums der
Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
- 1983 Beginn der Dissertation am Institut
für Tierpathologie, Abteilung Funktio-
nelle Pathologie (Prof. Dr. Dr.
D. Stavrou) der Universität München
- 1984 30. November Approbation als Tier-
ärztin
- 1985 1. Januar bis 30. Juni Tätigkeit als
wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
für Tierpathologie, Abteilung Funktio-
nelle Pathologie.
- Ab 1. Juli freie Forschungstätigkeit
am Institut für Tierpathologie, Abtei-
lung Funktionelle Pathologie, mit dem
Ziel der Promotion.

